



# **Universidad Nacional Mayor de San Marcos**

**Universidad del Perú. Decana de América**

**Facultad de Farmacia y Bioquímica**

**Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica**

## **Actividad antimicrobiana y antioxidante del extracto etanólico de Prosopis pallida “algarrobo”**

### **TESIS**

**Para optar el Título Profesional de Químico Farmacéutico**

### **AUTOR**

**Cynthia Obdulia Raquel CARDENAS CAMACHO**

### **ASESOR**

**Julio Reynaldo RUIZ QUIROZ  
Américo Jorge CASTRO LUNA**

**Lima, Perú**

**2017**



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

## Referencia bibliográfica

---

Cardenas C. Actividad antimicrobiana y antioxidante del extracto etanólico de *Prosopis pallida* “algarrobo”. [Tesis de pregrado]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica; 2017.

---

318



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS  
(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)  
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA



ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

Los Miembros del Jurado Examinador y Calificador de la Tesis titulada:

"Actividad antimicrobiana y antioxidante del extracto etanólico de *Prosopis pallida*  
(Algarrobo)"

Que presenta la Bachiller en Farmacia y Bioquímica:

CYNTHIA OBDULIA RAQUEL CARDENAS CAMACHO

Que reunidos en la fecha se llevó a cabo la SUSTENTACIÓN de la TESIS, y después de las respuestas satisfactorias a las preguntas y objeciones formuladas por el Jurado, y practicada la votación han obtenido la siguiente calificación:


18 (Dieciocho) - sobresaliente

en conformidad con el Art. 34.º del Reglamento para la obtención del Grado Académico de Bachiller en Farmacia y Bioquímica y Título Profesional de Químico Farmacéutico(a) de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

Lima, 08 de febrero de 2017

  
Dr. Victor Izaguirre Pasquel  
Presidente

  
Dra. Maria Elena Salazar Salvatierra  
Miembro

  
Mg. Elizabeth Chavez Hidalgo  
Miembro

  
Q.F. Walter Rivas Altez  
Miembro

PROFESIÓN DEL MEDICAMENTO, DEL ALIMENTO Y DEL TÓXICO\*

20 3101  
BUREAU VERITAS  
Certification  
N° 04211061



## DEDICATORIA

**A mi madre Santa Obdulia** por su infinito amor, por su ejemplo de lucha y perseverancia, por su motivación constante que ha permitido desarrollarme a nivel personal y profesional.

**A mi padre José** por haberme apoyado siempre en todo momento, por sus consejos y su amor que ha sido mi fortaleza.

**A mi hermano José** por su incondicional apoyo, por su confianza y por ser mi mejor ejemplo a seguir.

**A la memoria de mis abuelos Ismael y Eloiza,** por hacer de mí una persona de bien.

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad Nacional Mayor de San Marcos mi alma mater por formarme y orientarme a ser una buena profesional de la salud.

A mi asesor de tesis, **Mg. Julio Reynaldo Ruiz Quiroz** por su generosidad y por compartir sus conocimientos y su amplia experiencia en un ambiente de confianza y amistad para culminar el presente trabajo.

A mi co-asesor, **Dr. Américo Jorge Castro Luna**, por su gran calidad humana y su gran experiencia en el campo de los recursos vegetales.

A mis compañeros **Jackeline y Arnaldo**, por su valioso apoyo en la parte experimental de este trabajo.

## ÍNDICE

RESUMEN	
ABSTRACT	
I. INTRODUCCIÓN	1
OBJETIVOS	3
II. GENERALIDADES	4
2.1. Antecedentes	4
2.2. <i>Prosopis pallida</i>	5
2.3. Clasificación taxonómica	6
2.4. Descripción botánica	6
2.5. Composición química	8
2.6. Usos y propiedades	11
2.7. Polifenoles	12
2.7.1. Ácidos fenólicos	13
2.7.2. Flavonoides	14
2.7.3. Taninos	19
2.8. Actividad antimicrobiana	24
2.9. Actividad antioxidante	27
III. PARTE EXPERIMENTAL	33
3.1. Materiales, equipos y reactivos	33
3.2. Entidades donde se desarrolló la investigación	34
3.3. Tipo de investigación	34
3.4. Flujograma del trabajo experimental	35
3.5. Recolección e identificación del material	35
3.6. Preparación del extracto etanólico	36
3.7. Estudio farmacognóstico	36

3.8.	Determinación de la cantidad de fenoles	
	totales mediante el reactivo de Folin-Ciocalteu	37
3.9.	Determinación de la actividad antibacteriana	38
3.10.	Determinación de la actividad antioxidante	41
3.11.	Métodos estadísticos para el análisis de los resultados	44
IV.	RESULTADOS	45
4.1	Estudio farmacognóstico	45
4.2.	Cuantificación de fenoles totales	46
4.3.	Actividad antimicrobiana	47
4.4.	Actividad antioxidante	55
V.	DISCUSIÓN	65
VI.	CONCLUSIONES	70
VII.	RECOMENDACIONES	71
VIII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72
IX.	ANEXOS	84



## **ABREVIATURAS**

**DPPH:** Radical 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo

**ABTS<sup>•+</sup>:** Acido 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolín)-6-Sulfónico

**ROS:** Especies reactivas de oxígeno

**PGG:** Pentagaloil glucosa

**LDL:** Lipoproteínas de baja densidad

**ASC:** Ascorbato

**GSH:** Glutatión

**CAT:** Catalasa

**GR:** Glutatión reductasa

**MDHAR:** Monodehidroascorbato reductasa

**DHAR:** Dehidroascorbato reductasa

**ASC-GSH:** Ascorbato-glutatión

**SOD:** Superoxidasa dismutasa

**APX:** Ascorbato peroxidasa

**DHAR:** Dehidroascorbato reductasa

**EC50:** Concentración efectiva media

**CMI:** Concentración Mínima Inhibitoria

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: <i>Prosopis pallida</i> .....	5
Figura 2: Aspecto interno del fruto de <i>Prosopis pallida</i> .....	8
Figura 3: Estructura de los principales grupos de polifenoles.....	12
Figura 4: Estructuras químicas de los ácidos fenólicos.....	14
Figura 5: Estructura básica del flavonoide.....	15
Figura 6: Tipos de flavonoides.....	16
Figura 7: Estructura de la quercetina .....	17
Figura 8: Estructura química del ácido gálico.....	21
Figura 9: Estructura básica de los taninos.....	23
Figura 10: Ciclo ascorbato-glutación.....	31
Figura 11: Diagrama de flujo metodología.....	35
Figura 12: Reacción del ácido gálico con el reactivo de Folin-Ciocalteu...	37
Figura 13: Estructura del DPPH .....	42
Figura 14: Estructura del ABTS .....	43
Figura 15: Curva de calibración del ácido gálico .....	46
Figura 16: Actividad antimicrobiana de los extractos de hojas, vaina y semilla por el método de difusión en agar contra <i>Staphylococcus aureus</i> .....	48

Figura. 17: Actividad antimicrobiana de los extractos de hojas, vaina y semilla por el método de difusión en agar contra <i>Bacillus subtilis</i> .....	48
Figura 18: Actividad antimicrobiana de los extractos de hojas, vaina y semilla por el método de difusión en agar contra <i>Escherichia coli</i> ...	49
Figura 19: Actividad antimicrobiana de los extractos de hojas, vaina y semilla por el método de difusión en agar contra <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	49
Figura 20: Determinación de la actividad antimicrobiana por el método de difusión en agar.....	50
Figura 21: Halo de inhibición de los extractos etanólicos de <i>Prosopis pallida</i> y Ciprofloxacino (control) frente a <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923.....	50
Figura 22: Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria de los extractos etanólicos de <i>Prosopis pallida</i> por el método de microdilución colorimétrica contra <i>Staphylococcus aureus</i> .....	52
Figura 23: Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria de los extractos etanólicos de <i>Prosopis pallida</i> por el método de microdilución colorimétrica contra <i>Staphylococcus epidermidis</i> .....	52
Figura 24: Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria de los extractos etanólicos de <i>Prosopis pallida</i> por el método de microdilución colorimétrica contra <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	53

Figura 25: Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria de los extractos etanólicos de <i>Prosopis pallida</i> por el método de microdilución colorimétrica contra <i>Escherichia coli</i> .....	53
Figura 26: Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria de los extractos etanólicos de <i>Prosopis pallida</i> por el método de microdilución colorimétrica contra <i>Bacillus subtilis</i> .....	54
Figura 27: Determinación de la Concentración Efectiva media (EC50) de <i>Prosopis pallida</i> por el método de DPPH.....	55
Figura 28: Correlación entre el extracto etanólico de las hojas de <i>Prosopis pallida</i> vs Absorbancia, DPPH.....	56
Figura 29: Correlación entre el extracto etanólico de la vaina de <i>Prosopis pallida</i> vs Absorbancia, DPPH.....	57
Figura 30: Correlación entre el extracto etanólico de la semilla de <i>Prosopis pallida</i> vs Absorbancia, DPPH.....	58
Figura 31: Correlación entre solución patrón de Trolox vs Abosrbancia,...	59
Figura 32: Determinación de la Concentración Efectiva media (EC50) de <i>Prosopis pallida</i> por el método de ABTS <sup>•+</sup> .....	60
Figura 33: Correlación entre extracto etanólico de las hojas de <i>Prosopis pallida</i> vs Absorbancia, ABTS <sup>•+</sup> .....	61
Figura. 34: Correlación entre extracto etanólico de la vaina de <i>Prosopis pallida</i> vs Absorbancia, ABTS <sup>•+</sup> .....	62

Figura. 35: Correlación entre extracto etanólico de la semilla de <i>Prosopis pallida</i> vs Absorbancia, ABTS <sup>•+</sup> .....	63
Figura. 36: Correlación entre solución patrón de Trolox vs Absorbancia del radical ABTS <sup>•+</sup> .....	64
Figura 37: Reducción de resazurina.....	85
Figura 38: Diseño de la placa de microdilución colorimétrica.....	85
Figura 39: Cromatografía en capa fina del extracto etanólico de las hojas de <i>Prosopis pallida</i> .....	86
Figura 40: Reacción de precipitación de taninos con gelatina, marcha fitoquímica del extracto etanólico de hojas de <i>Prosopis pallida</i> .....	86
Figura 41: Reacción de precipitación de taninos con gelatina, marcha fitoquímica del extracto etanólico de la vaina (pulpa) de <i>Prosopis pallida</i> ...	87
Figura 42: Reacción de identificación de compuestos fenólico con cloruro férrico, marcha fitoquímica del extracto etanólico de las hojas de <i>Prosopis pallida</i> .....	87
Figura 43: Reacción de identificación de flavonoides con el reactivo de Shinoda, marcha fitoquímica del extracto etanólico de las hojas de <i>Prosopis pallida</i> .....	88

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1: Composición de la pulpa de <i>Prosopis pallida</i> .....	9
Tabla 2: Composición de aminoácidos en la semilla de <i>Prosopis pallida</i> .....	10
Tabla 3: Contenido de vitaminas en las semillas de <i>Prosopis pallida</i> .....	10
Tabla 4: Principales clases de compuestos antimicrobianos de las plantas...	26
Tabla 5: Cantidades de extracto seco de las muestras y litros de etanol 96° utilizados para la extracción por maceración.....	36
Tabla 6: Solventes de las muestras utilizadas para el ensayo de DPPH y ABTS*+ .....	44
Tabla 7: Marcha fitoquímica de los extractos etanólicos de <i>Prosopis pallida</i> (algarrobo).....	45
Tabla 8: Contenido de fenoles totales en los extractos etanólicos de las hojas, vaina (pulpa) y semillas de <i>Prosopis pallida</i> .....	46
Tabla 9: Actividad Antibacteriana del extracto etanólico de <i>Prosopis pallida</i> (algarrobo) por el método de difusión en agar.....	47
Tabla 10: Valores de la concentración mínima inhibitoria de <i>Prosopis pallida</i> (Algarrobo) sobre <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Bacillus subtilis</i> y <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	51
Tabla 11: Porcentaje de captación de radicales libres por el método DPPH	55
Tabla 12: Resultados de las actividad antioxidante del extracto etanólico de las hojas de <i>Prosopis pallida</i> por el método de DPPH.....	56

Tabla 13: Resultados de las actividad antioxidante del extracto etanólico de la vaina de <i>Prosopis pallida</i> por el método de DPPH.....	57
Tabla 14: Resultados de las actividad antioxidante del extracto etanólico de la semilla de <i>Prosopis pallida</i> por el método de DPPH.....	58
Tabla 15: Resultados de la actividad antioxidante de trolox por el método DPPH.....	59
Tabla 16: Porcentaje de captación radicales libres por el método de ABTS	60
Tabla 17: Resultados de la actividad antioxidante de extracto etanólico de las hojas de <i>Prosopis pallida</i> .....	61
Tabla 18: Resultados de la actividad antioxidante de extracto etanólico de la vaina de <i>Prosopis pallida</i> por el método de ABTS <sup>•+</sup> .....	62
Tabla 19: Resultados de la actividad antioxidante de extracto etanólico de las semillas de <i>Prosopis pallida</i> por el método de ABTS <sup>•+</sup> .....	63
Tabla 20: Resultados de la actividad antioxidante de trolox por el método de ABTS <sup>•+</sup> .....	64

## RESUMEN

El presente trabajo tuvo por objetivo evaluar las actividades antimicrobiana y antioxidante del extracto etanólico de *Prosopis pallida*. Para la evaluación de dichas actividades se obtuvo el extracto etanólico de las hojas, vaina (pulpa) y semillas. El contenido de polifenoles totales fue determinado por el método de Folin- Ciocalteu. La actividad antimicrobiana se evaluó mediante el método de difusión en agar frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 y la concentración mínima inhibitoria (CMI) por el método de microdilución colorimétrico en microplaca. La actividad antioxidante se determinó utilizando los métodos del radical libre 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo (DPPH) y el método del radical ácido 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolin) -6-sulfónico (ABTS<sup>•+</sup>). Las hojas de *Prosopis pallida* presentó mayor contenido de compuestos fenólicos expresado como 8,39 mg/Eq de ácido gálico /g de extracto seco. El extracto etanólico de las hojas de *Prosopis pallida* presentó actividad antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 con un CMI = 1000 µg/mL y frente a *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 con un CMI= 62,5 µg/mL. Los extractos de las hojas, vaina (pulpa) y semillas en el análisis de DPPH presentaron una concentración efectiva media (EC<sub>50</sub>) de 456,75 µg/mL; 392,15 µg/mL y 309,10 µg/mL; para el ensayo de ABTS<sup>•+</sup> mostraron un EC<sub>50</sub> de 4,7 mg/mL; 10,39 mg/mL y 9,90 mg/mL respectivamente.

**Palabras clave:** *Prosopis pallida* (algarrobo), polifenoles, antimicrobiana, antioxidante



## ABSTRACT

The present work had as objective to evaluate the antimicrobial and antioxidant activities of the ethanolic extract of *Prosopis pallida*. The ethanolic extract of leaves, pod (pulp) and seeds was obtained for the evaluation of these activities. The content of total polyphenols was determined by the Folin-Ciocalteu method. The antimicrobial activity was evaluated by the agar diffusion method against *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 and minimum inhibitory concentration (MIC) by microdilution colorimetric method. The antioxidant activity was determined using the 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl (DPPH) free radical method and the 2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazolin) -6-sulfonic acid radical method (ABTS •<sup>+</sup>). The leaves of *Prosopis pallida* presented higher content of phenolic compounds expressed as 8.39 mg/Eq of gallic acid/g of dry extract. The ethanolic extract from the leaves of *Prosopis pallida* presented antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 with a MIC = 1000 µg /mL and against *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 with a MIC = 62.5 µg/mL. The extracts of leaves, pod (pulp) and seeds in the DPPH analysis had a half effective concentration (EC<sub>50</sub>) of 456,75 µg/mL; 392,15 µg/mL and 309,10 µg/mL and in the ABTS•<sup>+</sup> assay showed an EC<sub>50</sub> of 4,7 mg/mL; 10,39 mg/mL and 9,90 mg/mL respectively.

**Key words:** *Prosopis pallida* (algarrobo), polyphenols, antimicrobial, antioxidant.

## I. INTRODUCCIÓN

El “algarrobo” es una leguminosa arbórea que se encuentra en zonas áridas y semiáridas del Perú; presentando gran resistencia a la sequía y a la salinidad. Su fruto, la algarroba, es una legumbre con altos contenidos de proteínas e hidratos de carbono<sup>1</sup>, propiedad por el cual su cultivo es importante en la industria alimentaria. En la medicina tradicional es utilizada para combatir la tos, bronquitis, resfriado, artritis y reumatismo<sup>2</sup>, siendo la presencia de compuestos fenólicos como flavonoides y taninos los responsables de su uso medicinal<sup>3</sup>.

En la actualidad, los gobiernos y los consumidores están interesados en el estudio de plantas medicinales, y están empezando a considerar los aspectos de la medicina natural para integrarlos en la prestación de servicios de salud que tiene como objetivo promover su uso seguro y eficaz<sup>4</sup>. La aparición de cepas resistentes a los antibióticos comerciales en los últimos tiempos, está creando la necesidad de buscar otras estrategias o alternativas para combatir las infecciones causadas por microorganismos<sup>5</sup>. Asimismo, los efectos carcinogénicos que producen las sustancias sintéticas como el hidroxianisol butilado (BHA) o el hidroxitolueno butilado (BHT), los cuales son eficientes secuestradores de radicales libres incrementan la búsqueda de antioxidantes de origen natural<sup>6</sup>.

Los compuestos fenólicos constituyen uno de los grupos más numerosos y representativos de metabolitos secundarios de las plantas, a dichos compuestos se les atribuye propiedades antimicrobianas y antioxidantes por diversos estudios *in vitro* realizados<sup>7</sup>.

Por lo expuesto, este trabajo tiene como principal protagonista a la especie *Prosopis pallida* “algarrobo” que desde tiempos ancestrales era representada en las cerámicas de las diferentes culturas en escenas de curación y sanación; por lo cual fue seleccionada como materia de estudio para evaluar otras propiedades curativas como su actividad antimicrobiana y antioxidante.

## OBJETIVOS

### OBJETIVO GENERAL

- Determinar la actividad antimicrobiana y antioxidante del extracto etanólico de *Prosopis pallida* “algarrobo”.

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Obtener el extracto etanólico de las hojas, vaina (pulpa) y semillas de *Prosopis pallida* y tamizaje de sus metabolitos secundarios.
- 2) Determinar la cantidad de fenoles totales en el extracto etanólico de las hojas, vaina (pulpa) y semillas de *Prosopis pallida* por el método de Folin-Ciocalteu.
- 3) Evaluar la actividad antimicrobiana del extracto etanólico de las hojas, vaina (pulpa) y semillas de *Prosopis pallida* mediante el método de difusión en agar.
- 4) Determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) del extracto etanólico de las hojas, vaina (pulpa) y semillas de *Prosopis pallida* mediante la prueba de microdilución colorimétrica en microplaca.
- 5) Establecer la concentración efectiva media (EC<sub>50</sub>) para la actividad antioxidante del extracto etanólico de las hojas, vaina (pulpa) y semillas de *Prosopis pallida* mediante el test de DPPH y ABTS<sup>•+</sup>.

## II. GENERALIDADES

### 2.1 Antecedentes

Stich H en 1991, reportó que los extractos de las hojas de *Prosopis chilensis* (Molina) Stuntz y *Prosopis tamarugo* Phil son eliminadores de radicales libres por el método DPPH; esto debido a la presencia de compuestos alcaloides<sup>8</sup>.

Mazzuca M et al. en el 2003, determinaron que las semillas de la especie *Prosopis alata* presenta actividades antibacteriana y antifúngica e identificaron a los ácidos grasos y triterpenos pentacíclicos como responsables de dichas actividades<sup>9</sup>.

Bussman et al. en el 2010, hallaron que el extracto etanólico de las hojas de *Prosopis pallida* presenta actividad antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus* mediante el método de difusión en agar<sup>10</sup>.

Seturamam D et al. en el 2014, reportaron que la actividad antibacteriana de las hojas de *Prosopis juliflora* es más eficaz que la bacitracina, gentamicina, cloromicetina y trimetropina contra *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus lactis*, *Staphylococcus faecalis*, *Staphylococcus pyogenes* y *Corynebacterium diphtheriae*<sup>11</sup>.

Muñoz A et al. en el 2014, encontraron un alto contenido de ácido cumárico en la miel de *Prosopis pallida* (1,572 ppm), su capacidad antioxidante es relacionada a su contenido de compuestos fenólicos<sup>12</sup>.

Schmeda et al. en el 2015, reportaron que las muestras de harina de *Prosopis chilensis* exhiben un contenido de fenoles totales que oscila entre 0,82 a 2,57 g equivalentes de ácido gálico / 100 g de peso fresco harina. Se atribuyó su

capacidad antioxidante a la presencia de compuestos fenólicos como glucósidos de flavonol, flavonas C-glicosilo y derivados de ácido elágico<sup>13</sup>.

Lakshmibai R. en el 2015, determinó la presencia de flavonoides, esteroides, compuestos fenólicos, alcaloides, carbohidratos y proteínas en las hojas de *Prosopis juliflora*, además presentó un 98% de inhibición de radicales libres por el método DPPH a una concentración de 50 mg/mL<sup>14</sup>.

## **2.2. *Prosopis pallida***

Pertenece al género *Prosopis*, dicho género está descrito dentro de la familia Fabaceae y comprende alrededor de 47 especies. Todas las especies son originarias de territorios áridos y semiáridos en América, con unas pocas excepciones en África y el sudeste de Asia. Las especies son árboles o arbustos, menos frecuente subarbustos, normalmente xerófilos y espinosos. *Prosopis pallida* es un árbol que crece bajo condiciones de clima templado con tendencia al calor y puede alcanzar una altura de hasta 20 m (Figura 1). La especie *Prosopis pallida* es la más dominante en la costa del Perú, esta fue documentada en 13 departamentos, desde Tumbes a Tacna, principalmente en la zonas costeras de 0-1500 msnm<sup>15</sup>.



**Figura 1.** *Prosopis pallida*

### 2.3. Clasificación taxonómica (Anexo 1)

Según el sistema de Clasificación de Cronquist (1981).

**Reino:** Plantae

**División:** Magnoliophyta

**Clase:** Magnoliopsida

**Subclase:** Rosidae

**Orden:** Fabales

**Familia:** Mimosaceae

**Género:** *Prosopis*

**Especie:** *Prosopis pallida* (Humboldt & Bonpland ex Willdenow) H.B.K

### 2.4. Descripción botánica

**Inflorescencia:** Las flores son pequeñas, de 4-6 mm de largo, de color amarillo pajizo; son hermafroditas y a veces estériles, actinomorfas y pentámeras. El cáliz es acampanado, de color amarillo verdoso y ciliada por fuera con un largo entre 0.5-1.5 mm. La corola es 3 a 3,2 mm de largo, sus pétalos de 2,5 – 3,0 mm de largo con vellosidades dentro. Presenta cinco estambres de 4- 7 mm de largo; pistilos de 4-5 mm de largo; sus ovarios son de color verde claro y de 1,5 - 1,8 mm de largo. Las anteras tienen un apéndice glandular. El pedúnculo es corto de 0,5 - 3,0 mm de largo. La especie *P. pallida* en Perú, Díaz Celis (1995) observó 237- 366 flores por inflorescencia<sup>16</sup>.

**Hojas:** Las hojas son bipinnadas y alternas cuando son jóvenes; es común ver en los nudos de las plantas adultas de 1 a 10 hojas que nacen en ramitas

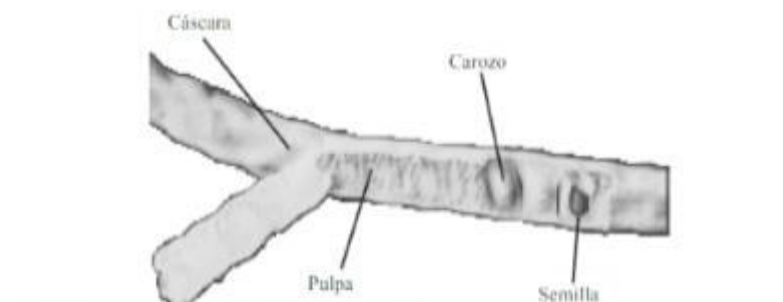
muy cortas y juntas, de 2 a 8 cm de longitud, falcadas dorsalmente. Sus folíolos son lineales, obtusos, mucronados, regularmente pubescentes, de 7 a 10 mm de longitud por 1 a 3 mm de ancho, con presencia de glándulas cupuliformes en la unión de cada par de foliolos<sup>16</sup>.

**Tallo y ramas:** *Prosopis pallida* es un árbol de hasta 20 m de alto o arbusto de 3 a 4 m, con tronco de 40 a 80 cm de diámetro, que a edad avanzada puede tener 2 m. Presenta ramas principales algo fastigiadas (45° o menos), ramas terminales casi rectas, horizontales; braquiblastos poco desarrollados, de tipo ascendente y colgante que pueden llegar hasta el suelo<sup>17</sup>. Las ramas más gruesas se bifurcan desde los 10 cm sobre el suelo hasta 150 cm, estas presentan espinas estipulares, en la misma planta podemos encontrar ramas sin ellas<sup>18</sup>.

**Frutos:** El fruto es carnosos y dulce, de 16–25 cm de largo por 8–15 mm de ancho y 4–9 mm de grosor, con una punta de 6–21 mm de largo y curva. Las semillas son oblongas de hasta 6,5 mm de largo y 5 mm de ancho<sup>18</sup>. Su aspecto interno se puede apreciar en la figura 2.

**Raíz :** Presenta un sistema radicular bien diferenciado, con una o dos raíces pivotantes, que pueden llegar de 20 a 25 m, lo que les permite absorber agua de diferentes profundidades<sup>3</sup>; y raíces laterales que les sirven para absorber agua de lluvia rápidamente y fijarse en la parte superior del suelo. Éstas crecen paralelas a una profundidad que oscila entre 15 y 25 cm. Son las encargadas de nutrir al árbol ya que poseen los pelos absorbentes<sup>18</sup>.





**Figura 2.** Aspecto interno del fruto de *Prosopis pallida* <sup>1</sup>

## **2.5. Composición química de *Prosopis pallida***

**Hojas:** Las hojas de *Prosopis pallida* muestran altos niveles de proteína cruda (17,8%) y fibra cruda (23,3 %). Entre sus minerales presenta fósforo (0,10 %), potasio (1,35%), calcio (1,49 %) y magnesio (0,75%). Presenta taninos, flavonoides y polifenoles, además tiene un contenido de taninos generalmente alto de 0,8% o 1,9-2,0% <sup>19,20</sup>.

**Pulpa (Vaina):** La pulpa representa aproximadamente el 56% del peso total del fruto<sup>21</sup>. En Perú se han realizado varios estudios para determinar la composición química de la pulpa de *P. pallida*, los resultados se resumen en la Tabla 1.

**Tabla 1.** Composición de la pulpa de *Prosopis pallida*

Componentes principales (g/100 g b.s.)		Aminoácidos (g/100 g proteína)		
				WHO/FAO patrón
Azúcares solubles totales	48,5	Hidroxiprolina	2,13	4
Sacarosa	46,1	Ácido aspártico	8,51	
Fructosa	1,26	Treonina	4,68	
Glucosa	1,02	Serina	4,96	
Xilosa	0,27	Ácido glutámico	10,07	3,5
Fibra dietética total	32,2	Prolina	23,40	
Fibra dietética insoluble	30,6	Glicina	4,68	
Fibra dietética soluble	1,6	Alanina	4,26	
Proteína (N x 6,25)	8,1	Cisteína	0,43	4
Suma de aminoácidos	7,1	Metionina	0,57	
Proteína resistente	2,2	Met + Cis	1,00	
Grasa	0,77	Valina	7,80	
Cenizas	3,6	Isoleucina	3,26	7
Taninos condensados	0,41	Leucina	7,94	
Polifenoles solubles totales	0,81	Tirosina	2,84	
		Fenilalanina	2,98	
		Tir + Fen	5,82	6
		Lisina	4,26	
		Histidina	1,99	
		Arginina	4,82	
		Triptófano	0,89	1

Minerales (g/kg b.s.)		Vitaminas (mg/kg muestra)	
Potasio	26,5	Vitamina A	no detectada
Sodio	1,1	Vitamina E	5
Calcio	0,76	Vitamina B1	1,9
Magnesio	0,9	Vitamina B2	0,6
Cobre	trazas	Vitamina B6	2,35
Zinc	trazas	Ácido nicotínico	31
Manganeso	trazas	Vitamina C	60
Hierro	0,33	Ácido fólico	0,18
		Pantotenato de calcio	10,5

Fuente: Cruz, 1987<sup>21</sup>. Contribución al estudio de la composición química de los frutos

**Semillas:** Las semillas de *P. pallida* contiene 65% de proteína, lo cual representa el 31% del peso de esta<sup>1</sup>. La composición de aminoácidos de las semillas se muestra en la Tabla 2 y el contenido de vitaminas en la Tabla 3.

**Tabla 2.** Composición de aminoácidos en la semilla de *Prosopis pallida*

Aminoácidos (g/100 g proteína)		WHO/FAO patrón
Ácido aspártico	8,30	4
Treonina	2,42	
Serina	4,87	
Ácido glutámico	21,31	
Prolina	7,49	3,5
Glicina	4,59	
Alanina	4,34	
Cisteína	1,31	
Metionina	0,88	4
Met + Cis	2,19	
Valina	4,56	
Isoleucina	3,09	
Leucina	7,51	7
Tirosina	1,84	6
Fenilalanina	4,29	
Tir + Fen	6,13	
Lisina	4,09	
Histidina	3,10	5,5
Arginina	14,63	1
Triptófano	1,37	

Fuente: Cruz, 1987<sup>21</sup>. Contribución al estudio de la composición química de los frutos

**Tabla 3.** Contenido de vitaminas en las semillas de *Prosopis pallida*

Vitamin	mg/kg of original matter
A	not detected
E	47.00
B1	7.30
B2	0.60
B6	0.64
Nicotinic acid	15.00
C	210.00
Folic acid	0.69
Calcium pantothenate	17.10

Fuente: Cruz, 1987<sup>21</sup>. Contribución al estudio de la composición química de los frutos

## 2.6. Usos y propiedades

*Prosopis pallida* es un árbol multipropósito, pionero en la recuperación de la fertilidad de los suelos por su capacidad de fijación de nitrógeno desde la atmósfera y la adición de materia orgánica a partir de las hojas. Es una especie valiosa para la reforestación por su precocidad y su tolerancia a la sequía. Sus hojas acumuladas en el suelo forman un mantillo de capa gruesa que es apreciado como abono orgánico, siendo utilizado en la fertilización de campos cultivados y para acondicionar frutos. Actualmente se ha incrementado el interés por el polen y néctar de las flores de algarrobo; en algunos lugares son preferidos por la miel transparente que producen. En una evaluación realizada entre distintas especies de *Prosopis*, *Prosopis pallida* ocupó el primer puesto en la producción de néctar y resinas y el segundo lugar en el polen<sup>22</sup>.

Los frutos de *Prosopis pallida* por su composición tienen numerosas aplicaciones potenciales en la industria alimenticia. La harina tostada de algarroba puede reemplazar hasta un 50% el cacao utilizado en chocolates y en las recetas de pastelería y helados. Se caracteriza por tener un bajo contenido en grasas y ausencia de teobromina y cafeína. La harina de algarroba sin tratamiento presenta el 32,2% de fibra y con extracción previa de azúcares un 67,6% de fibra. Se usó su harina como ingrediente de panificación, encontrando aceptable hasta un 10% de la harina de trigo. La casi total ausencia de almidón en la harina de algarroba limita su uso en pan como levadura. La producción de proteína es un hecho, el problema principal de este proceso radica en la presencia de polifenoles, pero dada la mayor

cantidad de azúcares y menor de polifenoles en la pulpa de *P. pallida*, el fruto de esta especie es excelente para este fin<sup>22</sup>.

## 2.7. Polifenoles

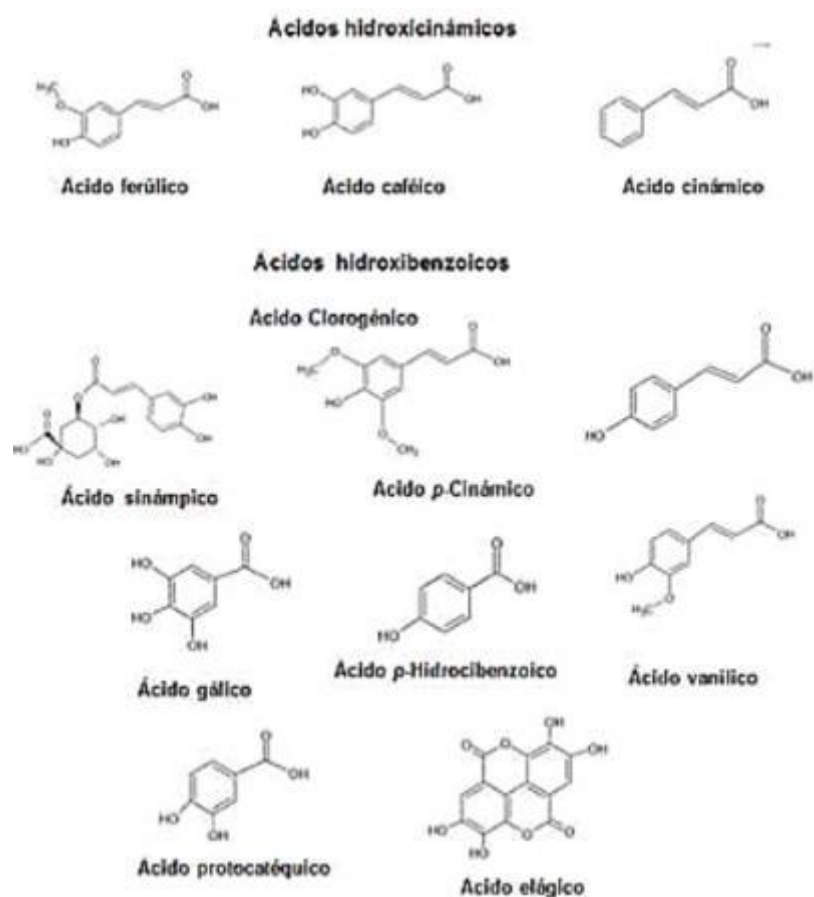
En la naturaleza existe una amplia variedad de compuestos que presentan una estructura molecular caracterizada por la presencia de uno o varios anillos fenólicos. Estos compuestos podemos denominarlos polifenoles que se originan principalmente en las plantas en grandes cantidades como producto de su metabolismo secundario. Algunos son indispensables para las funciones fisiológicas vegetales, otros participan en funciones de defensa ante situaciones de estrés y diversos estímulos (hídrico, luminoso, etc.). Existen varias clases y subclases de polifenoles que se definen en función al número de anillos fenólicos que poseen y de los elementos estructurales que presentan estos anillos. Los principales grupos de polifenoles son: ácidos fenólicos (derivados del ácido hidroxibenzoico o del ácido hidroxicinámico), estilbenos, lignanos, alcoholes fenólicos y flavonoides (Figura 3)<sup>23</sup>.



**Figura 3.** Estructura de los principales grupos de polifenoles<sup>23</sup>

### **2.7.1. Ácidos fenólicos**

Los ácidos fenólicos pertenecen a los grupos fenólicos simples que tienen un anillo aromático con uno o más sustituyentes hidroxilo, incluyen los derivados del ácido hidroxibenzóico y del ácido hidroxicinámico. Algunos ejemplos (Figura 4) son: ácidos caféico (3,4-hidroxicinámico), ácido ferúlico (4-hidroxi-3-metoxicinámico), ácido p-cumárico (4-hidroxicinámico), ácido sinámpico (4-hidroxi-3,5-dimetoxicinámico) y ácido clorogénico (5 cafeoil quínico)<sup>24</sup>. Los ácidos hidroxicinámicos constituyen un amplio grupo de sustancias químicas. Sus principales funciones en las células vegetales son las de actuar como metabolito para el crecimiento y reproducción de las plantas, además participan como agentes protectores frente a la acción de patógenos como parte de su mecanismo de defensa, presentan funciones como anticancerígenas, antiinflamatorias y antioxidantes<sup>25</sup>. La distribución de estos compuestos se encuentran en las células y tejidos vegetales de la pared ligados a compuestos tipo éster, tal es el caso del ácido ferúlico y ácido p-cumárico que han sido encontrados en muchas especies de plantas<sup>26</sup>.



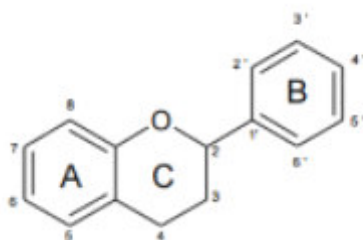
**Figura 4.** Estructuras químicas de los ácidos fenólicos<sup>24</sup>.

### 2.7.2. Flavonoides

Los flavonoides son pigmentos naturales presentes en los vegetales y que protegen al organismo del daño producido por agentes oxidantes, como los rayos ultravioletas, la polución ambiental, sustancias químicas presentes en los alimentos, etc. El organismo humano no puede producir estas sustancias químicas protectoras, por lo que deben obtenerse mediante la alimentación o en forma de suplementos<sup>27</sup>.

## A) Estructura química

Los flavonoides son compuestos de bajo peso molecular que están formados de dos anillos fenilos (A y B), ligados a través un anillo pirano (C), lo cual se presenta en un esqueleto de difenilpiranos: C6-C3-C6 (Figura 5). Los átomos de carbono en los anillos C y A se numeran del 2 al 8, y los del anillo B desde el 2' al 6' (Figura 5), dónde gracias a las variaciones del anillo pirano se logran diferentes tipos de flavonoides<sup>27, 28</sup>.



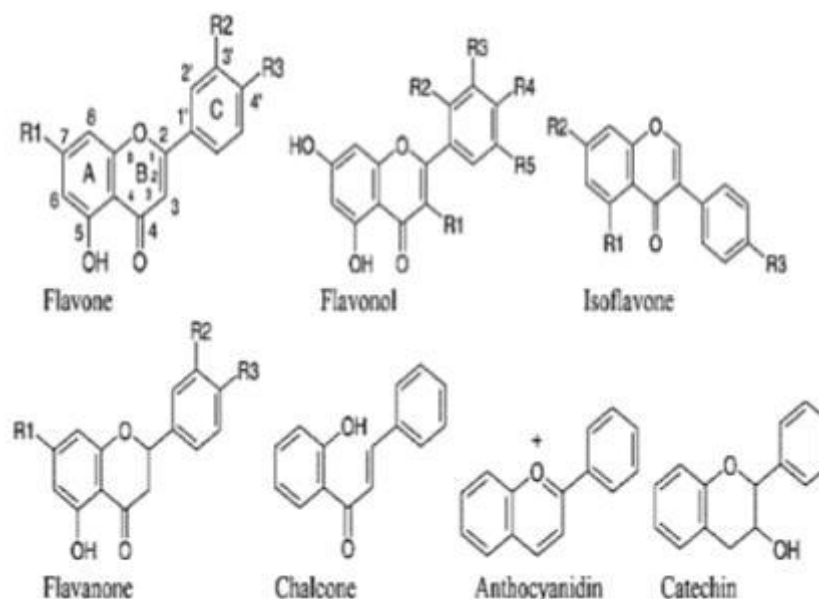
**Figura 5.** Estructura básica del flavonoide<sup>30</sup>.

## B) Clasificación

Los flavonoides son a menudo hidroxilados en las distintas posiciones de los anillos de la estructura base (Figura 5) que con frecuencia, uno o más de estos grupos hidroxilos son metilados, acetilados o sulfatados<sup>29</sup>. Los flavonoides son clasificados en varios subgrupos (Figura 6), en los cuales se establecen diferencias claras para cada uno ellos<sup>30</sup>, como:

- ❖ La presencia o ausencia del grupo carbonilo en el carbono 4
- ❖ La presencia o ausencia de un doble enlace entre los carbonos 2 y 3
- ❖ La sustitución del grupo fenil (Anillo B) en el carbono 2 o 3





**Figura 6.** Tipos de flavonoides<sup>29</sup>.

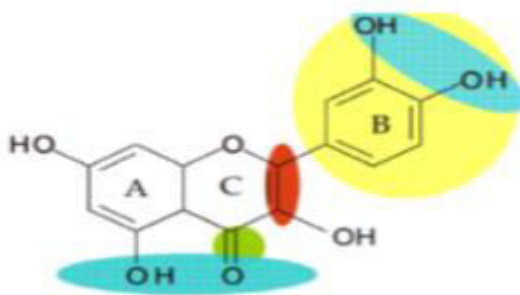
### C) Características físicas

Los flavonoides son sustancias sólidas cristalizadas de color blanco o amarillento. Sus heterósidos son solubles en agua caliente, alcohol y en disolventes orgánicos polares, siendo insolubles en los apolares. Sin embargo, cuando están en estado libre, son poco solubles en agua, pero son solubles en disolventes orgánicos más o menos oxigenados dependiendo de su polaridad<sup>31</sup>. Su carácter fenólico y su intensa absorción en la región ultravioleta y visible del espectro es debido a la presencia de sistemas aromáticos conjugados<sup>32</sup>.

## D) Propiedades biológicas

- **Propiedad antioxidante**

La actividad antioxidante de los flavonoides resulta de una combinación de sus propiedades quelantes de hierro y secuestradoras de radicales libres, además de inhibir las oxidasas: lipooxigenasa, ciclooxigenasa, mieloperoxidasa y la xantina oxidasa; evitando así la formación de especies reactivas de oxígeno y de hidroxiperóxidos orgánicos<sup>28,33</sup>. Con respecto a su estructura, los flavonoides con sustituyentes dihidroxílicos en posiciones 3' y 4' en el anillo B se muestran más activos como antioxidantes y es potenciado este efecto por la presencia de un doble enlace entre los carbonos 2 y 3, un grupo OH libre en la posición 3 y un grupo carbonilo en la posición 4, como sucede en la quercetina (Figura 7)<sup>33</sup>.



**Figura 7.** Estructura de quercetina, resaltando los grupos implicados en su actividad antioxidante<sup>33</sup>.

La quercetina es el flavonoide que reúne los requisitos para ejercer una efectiva función antioxidante, pues ésta es cinco veces mayor que la de las vitaminas C y E, además de poseer una hidrosolubilidad similar a esta última. Por eso la rutina (quercetina-3-b-D-rutinósido) es hasta el momento el único flavonoide en presentación farmacológica (combinada) en el mundo. Existe

efecto sinérgico con las vitaminas aludidas. Pues el ácido ascórbico reduce la oxidación de la quercetina, de tal manera que combinado con ella permite al flavonoide mantener sus funciones durante más tiempo. Por su parte la quercetina protege de la oxidación a la vitamina E. Los flavonoides retiran oxígeno reactivo, especialmente en forma de aniones superóxidos, radicales hidroxilos, hidroperóxidos y peróxidos lipídicos, bloqueando la acción deletérea de estas sustancias sobre las células dónde se ha corroborado la protección antioxidante de los flavonoides en: queratinocitos, fibroblastos dérmicos, ganglios sensoriales, endotelio, tejido nervioso y en lipoproteínas de baja densidad<sup>27, 28,33</sup>.

- **Propiedad antimicrobiana**

Muchas preparaciones fitoquímicas con alto contenido de flavonoides han reportado actividad antibacteriana. Los extractos de plantas con antecedentes en la medicina popular han sido estudiados mediante ensayos *in vitro*, como las especies *Hypericum*, *Capsella* y *Chromolaena*. Otros grupos de investigación han ido un paso más allá y han aislado e identificado las estructuras de los flavonoides que poseen actividad antibacteriana, dichos flavonoides son apigenina, galangina, pinocembrina, naringina, naringenina, galato de epigallocatequina y sus derivados, 7-O-glucósido de luteolina, quercetina, 3-O-metilquercetina y varios glicósidos de quercetina<sup>34</sup>.

La sinergia de los flavonoides con otros agentes antibacterianos ha demostrado que aumentan su actividad antibacteriana, por ejemplo se ha acomplexado 5-hidroxi-7,4-dimetoxiflavona con un número de metales de transición y se muestra que este proceso aumenta la actividad

antibacteriana<sup>35</sup>. Un estudio informó de una mayor actividad antibacteriana de la 3-metilenflavanonas cuando el anillo B contenía bromo o cloro como sustituyentes<sup>36</sup>. Un estudio indicó que 2, 4- o 2, 6-dihidroxilación del anillo B y 5,7-dihidroxilación del anillo A en la estructura flavanona era importante para actividad contra *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina<sup>37</sup>. Se evaluó la actividad de diferentes flavonoides incluyendo flavonas, flavanonas, isoflavonas e isoflavanones basado en el ensayo de difusión en agar disco de papel<sup>38</sup>. Se ha demostrado que el 5-hidroxiflavanonas y 5-hidroxiisoflavanonas con uno, dos o tres grupos hidroxilos adicionales en las posiciones 2 y 4 inhibieron la el crecimiento de *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sobrinus*. Sato et al. (1996) examinó dos isoflavonas con grupos hidroxilo en las posiciones 5, 2 y 4 usando un ensayo de dilución en agar, se detectó actividad frente a una amplia gama de estreptococos, esto puede sugerir que la hidroxilación en la posición 2 es importante para la actividad antibacteriana<sup>39</sup>.

### **2.7.3. Taninos**

Los taninos son polímeros polifenólicos producidos en las plantas como compuestos secundarios y que tienen la capacidad de formar complejos con proteínas, polisacáridos, ácidos nucleicos, esteroides y saponinas desempeñando en las plantas una acción defensiva se han identificado aproximadamente 500 especies de plantas que contienen cantidades significativas de taninos<sup>40</sup>. Entre las principales familias botánicas con importancia en la obtención de taninos se pueden citar las siguientes: *Anacardiaceae*, *Leguminosae*, *Rosaceae*, *Polygonaceae*, *Fagaceae*, *Rhizophoraceae* y *Myrtaceae*<sup>41</sup>.

## **A) Propiedades biológicas**

### **➤ Curación de heridas y cuidado de la piel**

Los taninos cumplen una función cicatrizante al acelerar la curación de las heridas y hemostática al detener el sangrado. La cicatrización se produce por la formación de las costras al unirse las proteínas con los taninos y crear un medio "seco" que impide el desarrollo de las bacterias<sup>42</sup>; estos al constreñir los vasos sanguíneos (vasoconstricción) ayudan a la coagulación de la sangre inhibiendo la transformación de plasminógeno a plasmina evitando así la fibrinólisis y, por tanto, contribuyen a la curación de las heridas<sup>43</sup>.

### **➤ Antioxidantes**

Los taninos son capaces de captar radicales libres e inhibir la peroxidación lipídica, además inhiben la autooxidación del ácido ascórbico (Vitamina C)<sup>43</sup>.

### **➤ Antibacterianas**

La función antibacteriana de los taninos se produce fundamentalmente al privar a los microorganismos del medio apropiado para que puedan desarrollarse. Esta propiedad está ligada a su capacidad para unirse a las proteínas de la piel (capacidad de combinarse con macromoléculas, en particular con hidratos de carbono y proteínas), que hace que las capas superficiales sean menos permeables y protejan a las capas subyacentes; resultado de los enlaces entre los taninos y las fibras de colágeno de la piel, que le confieren resistencia al agua, al calor y a la abrasión, los cuales se establecen por medio de interacciones hidrófobas y puentes de hidrógeno entre los grupos fenólicos de los taninos y las proteínas interviniendo también

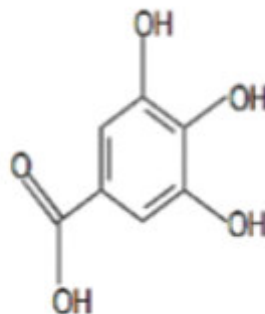
enlaces covalentes para asegurar la estabilidad en el tiempo de la combinación entre estos y las estructuras de colágeno<sup>44</sup>.

## B) Clasificación

Los taninos son clasificados en dos grupos basándose en su estructura química: los taninos hidrolizables y los taninos condensados.

### ➤ Taninos Hidrolizables.

Son ésteres de ácidos aromáticos carboxílicos, los cuales por hidrólisis ácida o enzimática producen un azúcar y un residuo fenólico de ácido gálico (Figura 8) o su dímero, el ácido elágico. Este tipo de taninos parecen ser los de mayor distribución en el reino vegetal. Generalmente constituyen mezclas complejas que contienen diferentes ácidos fenólicos esterificados en diferentes posiciones. Los taninos hidrolizables son generalmente amorfos, higroscópicos, de color amarillo parduzco, se disuelven en agua (especialmente caliente), para formar soluciones coloidales. A mayor estado de pureza son menos solubles en agua y más fácilmente se pueden obtener en forma cristalina<sup>45</sup>.



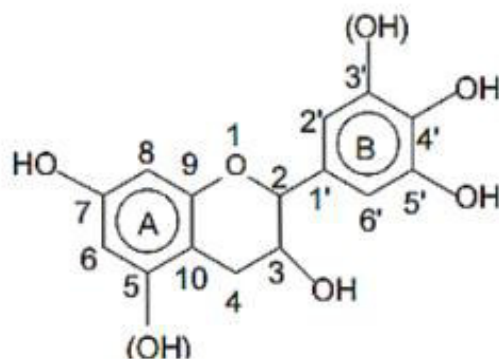
**Figura 8.** Estructura química del ácido gálico<sup>45</sup>.

El más estudiado de los taninos hidrolizables es el pentagalol glucosa (PGG), al que se le reconoce cierta actividad anti cancerígena, antidiabética y antioxidante en modelos experimentales *in vitro*. La actividad anti cancerígena *in vivo* de la PGG se ha probado para cáncer de próstata y pulmón, inhibiendo factores de crecimiento tumoral y vascular<sup>46</sup>. No sólo impidiendo el crecimiento de tumores, sino también disminuyendo su tamaño, bloqueando los procesos de angiogénesis (crecimiento vascular muy común en metástasis y la supresión de la expresión de oncoproteínas<sup>47</sup>. El efecto anti diabético fue probado con una variedad PGG en adipocitos, donde se observó que el tanino tenía un efecto muy similar al de la insulina, puesto que se unía a los receptores específicos de insulina de la membrana celular, favoreciendo el transporte de la glucosa al interior de la célula, aun en ausencia de esta hormona<sup>48</sup>.

En cuanto a su actividad como antioxidante, la PGG fue capaz de neutralizar *in vitro* especies altamente reactivas, como el superóxido y radical hidroxilo, así como disminuir la peroxidación de lípidos de membranas celulares<sup>46</sup>.

### ➤ **Taninos Condensados**

Los taninos condensados conocidos genéricamente como poliflavonoides o proantocianidinas están constituidos por flavonoides con diferentes grados de condensación (flavan-3-ol y flavan-3,4-diol) así como otros flavonoides análogos, carbohidratos y trazas de amino e imino ácidos<sup>45</sup>. La estructura básica de los taninos se presenta en la figura 9.



**Figura 9.** Estructura básica de los taninos condensados<sup>45</sup>.

Los taninos condensados han sido más estudiados respecto a su actividad antioxidante, además de que se ha reportado que poseen beneficios a la salud por su actividad antibacteriana o bacteriostática, anticarcinogénica, inhibidora de la peroxidación lipídica, y de la agregación plaquetaria relacionada a la formación de trombos en el sistema circulatorio. *In vitro*, se ha demostrado que los taninos condensados tienen una preferencia por neutralizar el radical libre hidroxilo ( $\bullet\text{OH}$ ). Así mismo, se demostró que tienen la capacidad de actuar como inhibidores no competitivos de la enzima xantina oxidasa, una de las mayores generadoras de radicales libres en el metabolismo celular. Por último, la actividad antioxidante de taninos condensados tiene la capacidad de evitar la oxidación de lipoproteínas de baja densidad (LDL) y por ello inhibe la formación de trombosis en personas con padecimientos cardiacos como la aterosclerosis<sup>48</sup>.



## 2.8. Actividad antimicrobiana

Las plantas son ricas en una amplia variedad de metabolitos secundarios, tales como taninos, alcaloides, terpenoides, y flavonoides, que presentan propiedades antimicrobianas *in vitro* (Tabla 4). Actualmente, más de la mitad de todos los productos farmacéuticos dispensados en los Estados Unidos tienen orígenes vegetales, pero muy pocos están destinados para su uso como antimicrobianos<sup>45</sup>. Se estima que hay entre 250.000 y 500.000 especies de plantas en la Tierra, un porcentaje relativamente pequeño (1-10%) son utilizados como alimentos y algunos para fines medicinales<sup>50</sup>. Las plantas tienen una capacidad casi ilimitada para sintetizar sustancias aromáticas que en su mayoría son fenoles, estas sustancias sirven como mecanismos de defensa de las plantas contra la depredación por microorganismos, insectos y herbívoros<sup>49,50</sup>.

Los fenoles simples y ácidos fenólicos son los bioactivos más simples, sus estructuras consisten en un solo anillo fenólico sustituido. El ácido cinámico y cafeico son representantes comunes de un amplio grupo de compuestos de derivados de fenilpropano que presentan el estado de oxidación más alto, las hierbas comunes como el estragón y el tomillo contienen ácido cafeico, que es eficaz contra los virus, bacterias y hongos<sup>51</sup>. Catecol y pirogalol ambos son fenoles hidroxilados, que han demostrado ser tóxicos para los microorganismos, el primero presenta dos grupos -OH y el segundo tiene tres<sup>49</sup>.

Los mecanismos responsables de la toxicidad fenólica a microorganismos, incluyen la inhibición de la enzima betaglucano-sintasa por los compuestos

oxidados, posiblemente a través de la reacción con grupos sulfhidrilo o a través de interacciones no específicas con proteínas<sup>52</sup>. Los aceites esenciales son a menudo citados como antimicrobianos, un ejemplo es el eugenol, representante característico que se encuentra en el aceite de clavo. Este es considerado como un bacteriostático contra los hongos y las bacterias<sup>49,53</sup>. Los flavonoides también son sustancias fenólicas hidroxiladas, pero estas unidas a un anillo aromático, que son sintetizadas por las plantas en respuesta a la infección microbiana. Su actividad es probablemente debido a su capacidad para formar complejos con las proteínas extracelulares y solubles, además de formar complejos con las paredes celulares bacterianas, más flavonoides lipófilos también pueden romper las membranas microbianas<sup>37,49</sup>.

Las catequinas, son flavonoides que han sido ampliamente investigados debido a su ocurrencia en el té verde donde se observó que ejercieron actividad antimicrobiana<sup>54</sup>; estos compuestos inhibieron *in vitro* al *Vibrio cholerae*, *Streptococcus mutans*, *Shigella* y otras bacterias, además inactivan la toxina del cólera y las glucosiltransferasas bacterianas en el *Streptococcus mutans*<sup>49</sup>. La delineación del posible mecanismo de acción de flavonas y flavonoides se ve obstaculizada por resultados contradictorios. Como se sabe, los flavonoides que carecen de grupos hidroxilos en sus  $\beta$ -anillos son más activos contra los microorganismos que los que tienen los grupos –OH, este hallazgo apoya la idea de que su objetivo es la membrana microbiana. Los compuestos lipofílicos serían más perjudiciales de esta estructura. Sin embargo, varios autores han encontrado también el efecto contrario; es decir, a mayor hidroxilación, mayor es la actividad antimicrobiana<sup>39,49</sup>.

**Tabla 4.** Principales clases de compuestos antimicrobianos de las plantas

Clase	Subclase	Ejemplo(s)	Mecanismo
Fenólicos	Fenoles	Catecol	Privación del sustrato
	Simple	Epicatequina	Destrucción de la membrana
	Ácidos Fenólicos	Acido cinámico	
	Quinonas	Hipericina	Enlazar adhesinas formando complejos con la pared,inactivaenzimas
	Flavonoides	Crisina	Enlazar adhesinas
	Flavonas	Abyssinone	Formar complejos con la pared celular
			Inactiva enzimas
			Inhibir la transcriptasa inversa del VIH
	Flavonoles	Totarol	
	Taninos	Elagitanino	Une a las proteínas
Terpenos, aceites esenciales			Enlazar adhesinas
			Inhibición de enzimas
Alcaloides			Privación del sustrato
			Formar complejos con la pared celular
Lectinas y polipéptidos			Destrucción de la membrana
			Formar complejos con el ión metálico
Poliacetilenos			Formar complejos con el ADN eucariota (actividad antiviral)
			Destrucción de la membrana
Alcaloides		Capsaicina	Destrucción de la membrana
Lectinas y polipéptidos		Berberina	Intercalarse en la pared celular y/o ADN
		Piperina	
Poliacetilenos		Manosa específica-Aglutina	Bloquea la fusión viral o adsorción
		Fabatin	Forma puentes disulfuros
Poliacetilenos		8S-Heptadeca-2(Z),9(Z)-dieno-4,6-diino-1,8-diol	

Fuente: Murphy, 1999<sup>49</sup>. Plant Products as Antimicrobial Agents.

## **2.9. Actividad antioxidante**

### **A) Estrés oxidativo**

El oxígeno en su forma más estable es poco reactivo con una velocidad de reacción a temperatura fisiológica baja; sin embargo por reacciones puramente químicas, por acciones enzimáticas o por efecto de las radiaciones ionizantes, se pueden producir una serie de especies químicas o sustancias prooxidantes (moléculas o radicales libres altamente reactivos) que son capaces de dar lugar a múltiples reacciones con otros compuestos presentes en el organismo, que llegan a producir daño celular. Por lo anteriormente expuesto se comprende que si bien el oxígeno es imprescindible para el metabolismo y las funciones del organismo, no se deben olvidar los muchos efectos tóxicos que posee. Por lo tanto el estrés oxidativo es causado por un desequilibrio entre la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS o ERO) y la capacidad de un sistema biológico de detoxificar rápidamente los reactivos intermedios o reparar el daño resultante<sup>55</sup>.

### **B) Radicales libres**

Los radicales libres son moléculas inestables con electrones desapareados en sus órbitas más externas. Estas partículas, altamente reactivas, pueden activar toda una serie de reacciones en cadenas, capaces de dañar fibras de colágeno, membranas celulares, estructuras nucleares, etc. También promueven la permeabilidad vascular y activan a una gran cantidad de sustancias que atraen neutrófilos, lo que desencadena la infiltración por los mismos en el músculo esquelético, originando una respuesta inflamatoria<sup>56</sup>. Los radicales libres se pueden formar en el interior de las células como

producto de sus actividades fisiológicas normales o a partir de procesos como la hipoxia, en la que se observa un aumento en la formación de radicales libres, que pueden inducir lipoperoxidación en la membrana de las células del cerebro y con esto alteraciones en la función del mismo. Los radicales libres pueden generarse también a partir de fuentes exógenas, como las radiaciones ionizante, ultravioleta, la visible o térmica, drogas antitumorales, algunos productos químicos carcinogénicos, agentes contaminantes, pesticidas y humo del cigarro; también diversos medicamentos pueden inducir la liberación de radicales libres, como el acetaminofén, la neomicina, la polimixina B, la kanamicina, la gentamicina y el cloranfenicol<sup>57</sup>.

Molecularmente son pequeñas moléculas ubicuitarias y difusibles que se producen por diferentes mecanismos entre los que se encuentran la cadena respiratoria mitocondrial, la cadena de transporte de electrones a nivel microsomal y en los cloroplastos, y las reacciones de oxidación, por lo que producen daño celular (oxidativo) al interactuar con las principales biomoléculas del organismo<sup>57</sup>. No obstante lo expresado anteriormente, los radicales libres del oxígeno tienen una función fisiológica en el organismo como la de participar en la fagocitosis, favorecen la síntesis de colágeno, y la síntesis de prostaglandinas, activan enzimas de la membrana celular, disminuyen la síntesis de catecolaminas por las glándulas suprarrenales, modifican la biomembrana y favorecen la quimiotaxis<sup>58</sup>. Las especies reactivas de oxígeno o sustancias prooxidantes son: Radical hidroxilo ( $\text{HO}^\bullet$ ), Peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), Anión superóxido ( $\text{O}_2^\bullet$ ), Oxígeno singlete ( $^1\text{O}_2$ ), Oxígeno nítrico ( $\text{NO}$ ), Peróxido ( $\text{ROO}^\bullet$ ), Semiquinona ( $\text{Q}^\bullet$ ) y Ozono<sup>55</sup>.

El daño celular producido por las especies reactivas del oxígeno ocurre sobre diferentes macromoléculas, en los lípidos es donde se produce uno de los mayores daños, en un proceso que se conoce como peroxidación lipídica que afecta a las estructuras ricas en ácidos grasos poliinsaturados, alterando la permeabilidad de la membrana celular y produciendo edema y muerte celular.

La peroxidación lipídica o enranciamiento oxidativo representa una forma de daño hístico que puede ser desencadenado por el oxígeno, el oxígeno singlete, el peróxido de hidrógeno y el radical hidroxilo. Los ácidos grasos insaturados son componentes esenciales de las membranas celulares, por lo que se cree son importantes para su funcionamiento normal; sin embargo, son vulnerables al ataque oxidativo iniciado por los radicales libres del oxígeno<sup>59</sup>.

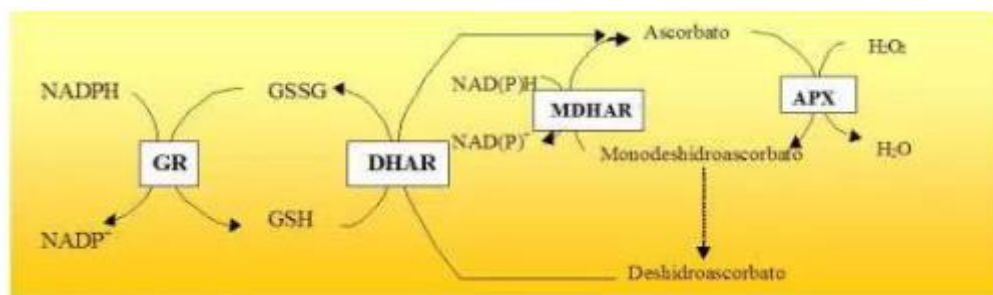
La molécula de ADN también es uno de los blancos de ataque de los radicales libres en la célula y las modificaciones que sufre como consecuencia de esos ataques son relevantes para la pérdida de la homeostasis celular, pérdida que puede prolongarse como consecuencia de las funciones del ADN como reservorio activo de información. En la molécula de ADN, los grupos nucleofílicos de la desoxirribosa y de las bases nitrogenadas quedan expuestos al ataque electrofílico de las especies reactivas del oxígeno (ERO), ya que llegan al interior del núcleo celular ya sean generadas como consecuencia de un agente externo, así como consecuencia de procesos metabólicos celulares. Existen diferentes tipos de daño oxidativo al ADN, entre los que se han reportado: modificación de las bases de ADN, ruptura de la cadena de ADN, mutaciones, activación de oncogenes e inactivación de genes supresores, etc.<sup>55,60</sup>.

### **C) Sistemas antioxidantes enzimáticos**

Los niveles celulares de ERO son estrictamente regulados por una compleja red de defensa antioxidante, que incluye reacciones enzimáticas y moléculas amortiguadoras antioxidantes que, junto con las enzimas productoras de ERO, mantienen la homeostasis en todos los compartimientos celulares controlando las cascadas de oxidación y protegiendo a las células contra daños oxidativos. Esta acción de defensa puede actuar minimizando la producción de ERO; o eliminando las ERO producidas, reduciendo la posibilidad de un eventual daño celular, en las células vegetales, los antioxidantes más importantes que regulan la homeostasis de ERO son el ascorbato (ASC) y el glutatión (GSH), además de taninos, flavonoides,  $\alpha$ -tocoferol, carotenoides y precursores de la lignina<sup>61</sup>.

Los carotenoides y flavonoides neutralizan ERO como  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\cdot\text{OH}$  y  $^1\text{O}_2$ . El  $\alpha$ -tocoferol es el principal antioxidante liposoluble en las membranas fotosintéticas, donde elimina  $^1\text{O}_2$  y protege los lípidos contra peroxidación<sup>61,62</sup>. El ASC es el más abundante y poderoso antioxidante hidrosoluble que protege las membranas mediante la reducción de la forma oxidada del  $\alpha$ -tocoferol y por la eliminación directa de  $\cdot\text{O}_2^-$  y  $\cdot\text{OH}$ ; es además sustrato del ascorbato peroxidasa (APX), que cataliza la reducción de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . El GSH se considera la defensa más importante contra ERO, además de estar involucrado en funciones vitales como el transporte y almacenamiento de azufre reducido, la protección contra metales tóxicos como precursor de fitoquelatinas y la detoxificación de xenobióticos a través de reacciones de conjugación por la glutatión-S-transferasa. La superóxido dismutasa (SOD) es la única enzima en las plantas que dismuta el  $\cdot\text{O}_2^-$  en  $\text{H}_2\text{O}_2$  y  $\text{O}_2$ . El  $\text{H}_2\text{O}_2$  puede ser

directamente catabolizado por catalasas (CAT) o, en presencia de sustratos reductores, por varios tipos de peroxidasas, en el ciclo ascorbatoglutación. Las enzimas ascorbato peroxidasa (APX), glutatión reductasa (GR), monodehidroascorbato reductasa (MDHAR) y dehidroascorbato reductasa (DHAR) actúan de forma coordinada en un ciclo llamado ciclo ascorbato-glutación (ASC-GSH) (Figura 10), cuya función es la de eliminar  $H_2O_2$  y regenerar los antioxidantes no enzimáticos ascorbato y GSH<sup>61,63</sup>.



**Figura 10.** Ciclo ascorbato-glutación<sup>60</sup>.

#### D) Sistemas antioxidantes no enzimáticos

La célula vegetal dispone de un conjunto de sistemas no enzimáticos que permiten regular y contrarrestar la agresión oxidativa que causan las ERO y otros agentes oxidantes. Estos compuestos neutralizan los radicales libres cediéndoles un electrón y dando lugar a la formación de especies no reactivas. Sin embargo, un antioxidante biológico eficaz debe hacer algo más que reaccionar con los radicales libres, debe estar presente y tener una concentración adecuada en la célula, reaccionar con una gran variedad de radicales libres y, ser capaz de regenerarse. En las células vegetales existen varios compuestos de naturaleza hidrosoluble como liposoluble que cumplen estas propiedades<sup>64</sup>.



Los principales antioxidantes de naturaleza hidrosoluble que controlan la homeóstasis redox son el ácido ascórbico, el glutatión y diversos compuestos fenólicos y, los de naturaleza liposolubles son los tocoferoles y los carotenoides. Los antioxidantes naturales, particularmente en las frutas y vegetales, han tenido un interesante crecimiento en el consumo y en la comunidad científica, ya que estas sustancias son las encargadas de la prevención de numerosas enfermedades que aquejan profundamente a la sociedad moderna. Los principales efectos beneficiosos de los antioxidantes naturales son relacionados con tres grandes grupos: vitaminas, compuestos fenólicos y carotenoides. La vitamina C es un antioxidante hidrosoluble, el efecto producido por esta vitamina está mediado por la interacción directa con varias especies reactivas del oxígeno incluidas el ozono y el óxido nítrico, la vitamina C neutraliza otras especies reactivas como el ácido hipocloroso, el singlete de oxígeno, etc que generan la forma activa de otros antioxidantes<sup>65</sup>.

La vitamina E es un antioxidante lipofílico, considerado un importante agente secuestrador de radicales peróxidos, oxígenos singlete y otras especies reactivas del oxígeno en las fases lipídicas biológicas como membranas y lipoproteínas; muy importante en los tejidos nervioso y muscular. Los compuestos fenólicos se encuentran en frutas y verduras en donde ejercen potente actividad antioxidante necesaria para el funcionamiento de las células vegetales, siendo los más representativos los compuestos denominados flavonoides, que protegen al organismo del daño producido por agentes oxidantes<sup>66</sup>.

### III. PARTE EXPERIMENTAL

#### 3.1. Materiales, equipos y reactivos

##### ❖ **Materiales**

Cuba cromatográfica, cromatofolios con silicagel GF 254, capilares para cromatografía, frascos ámbar (capacidad 2L), baguetas de vidrio, mortero, molino de cuchillas, embudos de vidrio, pipetas de vidrio de 1, 2, 5, 10 mL, beakers de vidrio de 50, 100, 500 mL, fioles de vidrio de 5, 10, 25, 50, 100 mL, probetas de vidrio de 50, 100, 250 mL, matraces de vidrio de 50, 250, 500 mL, papel filtro whatman N° 40, tubos de prueba, placas petri de vidrio, pipetas pasteur, micropipetas, tips, placas de poliestireno de 96 pozos (BRAND), celdas de cuarzo.

##### ❖ **Material biológico**

*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

##### ❖ **Equipos**

Estufa (L-C OVEN 0–200°C), balanza electrónica 1mg-200g (OHAUS), balanza digital 1g-2 kg, espectrofotómetro UV-visible (GENESYS 10S UV-VIS-Thermo Scientific).

##### ❖ **Reactivos**

Estándares de Trolox® (Sigma-Aldrich, USA), ácido 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo (Sigma-Aldrich, USA), ácido 2,2'-azino-bis-(3 ethilbenzotiazolin-6-sulfónico) (Sigma-Aldrich, USA), reactivo Folin-Ciocalteu (Sigma-Aldrich, USA), ácido gálico (Sigma-Aldrich, USA), persulfato de potasio (Sigma-Aldrich, USA), metanol absoluto

(J.T.Baker), etanol 96<sup>o</sup>, agua destilada, dimetilsulfóxido (Merck), reactivo Molish, reactivo Fehling, reactivo Mayer, reactivo Berthrand, reactivo Dragendorff, reactivo Ninhidrina 1 %, reactivo Liebermann Burchard, reactivo Shinoda, reactivo Borntranger, quercetina (Sigma-Aldrich, USA), sulfato de cerio, reactivo Tricloruro de hierro 5 %, reactivo gelatina 1 %, agar tripticasa soya (Merck), agar muelle hilton (Merck), caldo muelle hilton (Merck), resazurina (Sigma-Aldrich, USA).

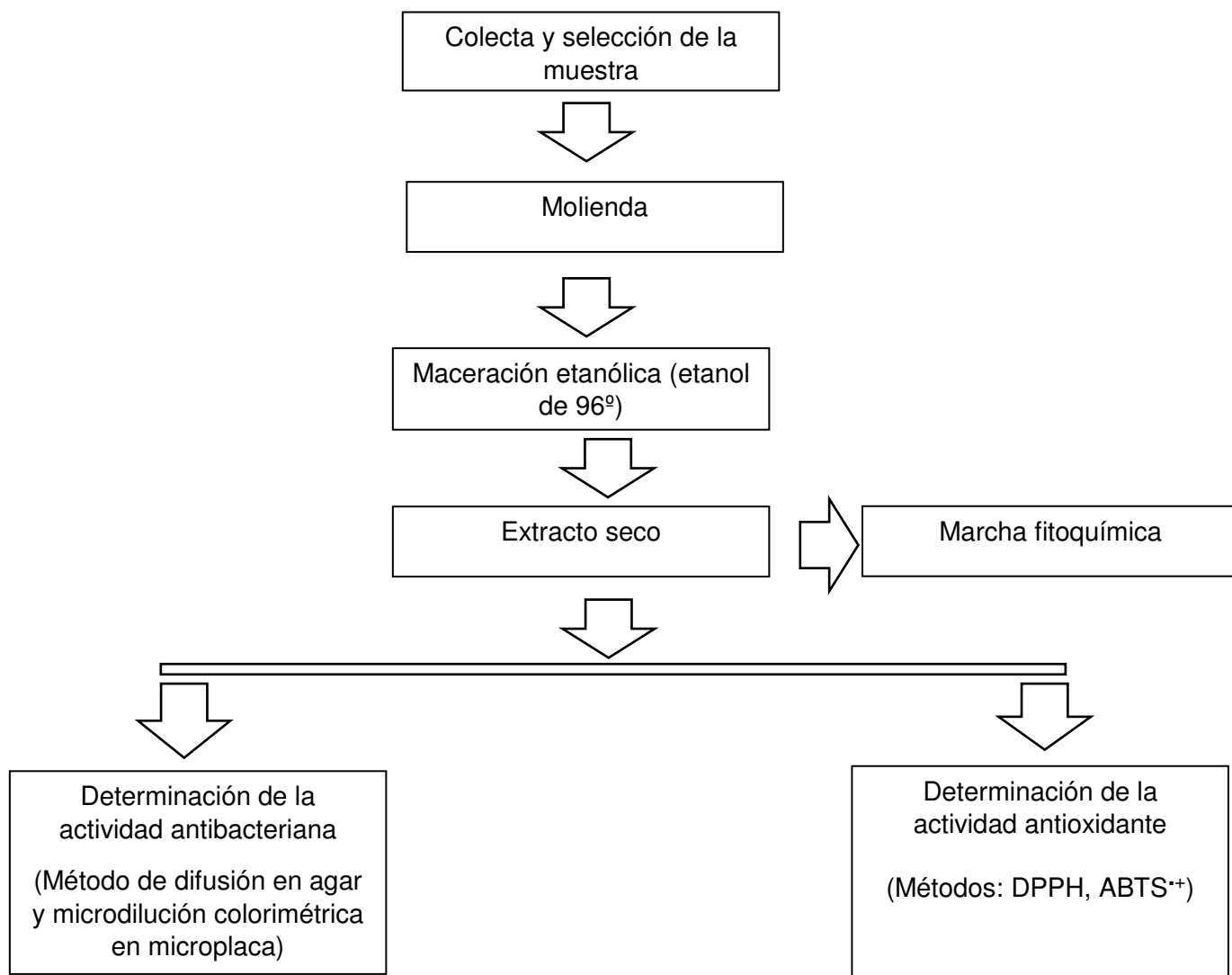
### **3.2. Entidades donde se desarrolló la investigación**

La obtención del extracto etanólico por el método de macerado, la marcha fitoquímica y la determinación de la actividad antioxidante se realizó en el Instituto de Investigación en Ciencias Farmacéuticas y Recursos Naturales “Juan de Dios Guevara” y la investigación de la actividad antimicrobiana se desarrolló en el Instituto de Investigación en Química Biológica, Microbiología, Biotecnología “Marco Antonio Garrido Malo”. Ambos institutos pertenecen a la facultad de Farmacia y Bioquímica de la UNMSM.

### **3.3. Tipo de Investigación**

Cuasiexperimental <sup>67</sup> y prospectivo <sup>68</sup>.

### 3.4. Flujograma del trabajo experimental



**Figura 11.** Diagrama de flujo de la metodología

### 3.5. Recolección e identificación del material

La planta fue colectada en los campos de la ciudad costera de Chiclayo (Lambayeque). Identificada y certificada en el Museo de Historia Natural de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos donde fue clasificada como *Prosopis pallida* (Humboldt & Bompland ex Willadenow) H.B.K “Algarrobo” (Anexo N° 1).

### 3.6. Preparación del extracto etanólico

Para la obtención de los extractos etanólicos de *Prosopis pallida* se empleó las hojas, vainas (pulpa) y semillas que fueron previamente seleccionadas. Posteriormente se secó en una estufa a 40°C. Se procedió a triturar y moler las muestras secas con la ayuda de un mortero y un molino de cuchillas. La cantidad de materia prima y etanol de 96° utilizado para la extracción por el proceso de maceración se indican en la tabla 5.

**Tabla 5.** Cantidad de materia prima y litros de etanol 96° utilizados para la extracción por maceración

	Materia prima (g)	Etanol 96 ° (L)
Hoja	500	3
Vaina	200	1
Semilla	150	0.5

Luego se sometió a extracción durante siete días con agitación y estos se conservaron en frascos de color ámbar en la oscuridad. Se filtró con papel Whatman N°40 y se concentró en la estufa a 40°C hasta sequedad. Al final se obtuvo una masa viscosa de color negruzca para el extracto de hojas , una masa pegajosa y de color marrón claro para el extracto de la vaina y una masa pegajosa y de color marrón oscuro para el extracto de las semillas de *Prosopis pallida* .

### 3.7. Estudio farmacognóstico

#### 3.7.1. Prueba de solubilidad

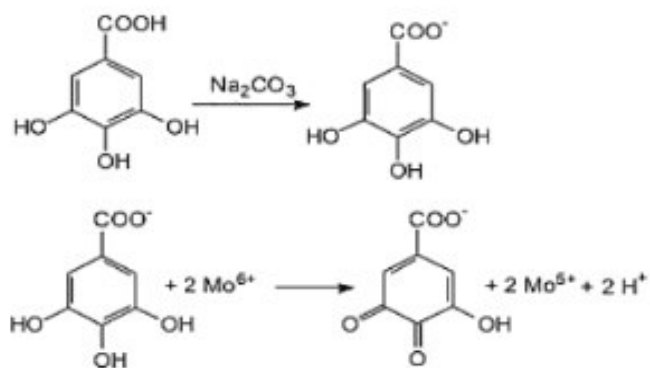
Se utilizaron solventes de acuerdo a su polaridad decreciente: agua, alcohol, cloroformo, benceno y éter etílico<sup>66</sup>.

### 3.7.2. Marcha fitoquímica

Se utilizó el extracto etanólico para la identificación de metabolitos secundarios que incluye reacciones de caracterización química de coloración y precipitación<sup>69,70</sup>.

### 3.8. Determinación de la cantidad de fenoles totales mediante el reactivo de Folin-Ciocalteu

**a) Fundamento:** Los compuestos fenólicos reaccionan con el reactivo de Folin-Ciocalteu (RFC), que mide la capacidad de reducir el ácido fosfomolibdico/fosfotungstico, en el cual, el molibdeno se encuentra en estado de oxidación VI, de color amarillo, que al ser reducido en un medio básico por los compuestos fenólicos (Figura 12), da un complejo de color azul intenso, cambiando el estado de oxidación del metal de VI a V; susceptible de una determinación espectrofotométrica a 765 nm<sup>71</sup>.



**Figura 12.** Reacción del ácido gálico con el reactivo de Folin - Ciocalteu

**b) Procedimiento:** Se realizó una curva de calibración de ácido gálico con las siguientes concentraciones: 10, 25, 50 y 250 µg/mL diluidas en agua destilada. Se preparó una solución de 0,8 mg/mL de cada extracto etanólico (muestra).

Se colocó en un tubo 100 µL de la solución muestra, se adicionó 500 µL del reactivo de Folin-Giocalteu y se dejó reposar durante 5 minutos, luego se adicionó 400 µL de carbonato de sodio 7,5 % w/v. Se mezcló y se dejó reposar 1 hora en oscuridad, transcurrido el tiempo se leyó a una longitud de onda de 765 nm en un espectrofotómetro UV-visible, el valor de fenoles totales fue expresado como mg/Equivalentes de ácido gálico / g de extracto seco<sup>72</sup>.

### **3.9. Determinación de la actividad antimicrobiana**

#### **➤ Método de difusión en agar**

**Fundamento:** Esta prueba se basa en la inhibición del crecimiento bacteriano, mediante la difusión de las sustancias activas en un medio sólido y se evidencia por la formación de halos claros alrededor de las colonias<sup>73,74</sup>.

#### **a) Microorganismos**

- *Staphylococcus aureus* ATCC 25923
- *Escherichia coli* ATCC 8739
- *Bacillus subtilis* ATCC 6633
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

#### **b) Preparación del inóculo**

Para la preparación de la suspensión del inóculo, se utilizaron a los microorganismos sembrados en placas de agar tripticasa soya (TSA) e incubadas a 37°C de 18 a 24 h. Se suspendieron los microorganismos en una solución salina estéril 0.9% y se ajustó la turbidez equivalente al tubo N° 0.5 ( $1,5 \times 10^8$  UFC/mL) de la escala de Mc Farland<sup>73,75</sup>.

### **c) Preparación de las placas**

El medio agar Mueller Hilton previamente reconstituido, esterilizado, enfriado y mantenido a 45 °C, fue inoculado con 1 mL de suspensión del inóculo ( $1,5 \times 10^8$  UFC/mL) por cada 100 mL de medio de cultivo, homogenizado y distribuido en placas Petri de vidrio estériles de 90 mm de diámetro, a razón de 20 mL por placa. Se dejó solidificar y se rotuló con el nombre del microorganismo testigo. Finalmente en condiciones estériles se procedió con un sacabocado de acero de 11 mm de diámetro externo para formar 3 pozos distribuidos equidistantemente en el interior de cada placa<sup>73, 75,76</sup>.

### **d) Preparación de las diluciones de los extractos.**

Se prepararon diluciones a partir de los extractos etanólicos secos (hojas, vaina y pepa), se diluyeron con dimetilsulfóxido (DMSO) hasta obtener concentraciones de 50 mg/mL y 100 mg/mL<sup>73,74</sup>.

### **e) Inoculación e incubación**

Se colocó 100 µL de las diluciones de los extractos etanólicos a evaluar en los pozos hechos previamente en cada placa. Se dejó reposar por 1 hora a temperatura ambiente y luego se llevó a una temperatura de incubación de 37°C por 24 horas, después de 24 horas de incubación se leyó el diámetro de las zonas de completa inhibición con un pie de rey o regla<sup>73</sup>.

#### **➤ Método de microdilución colorimétrico en microplaca**

**Fundamento:** Se basa en la inhibición del crecimiento bacteriano, mediante la dilución de los extractos respectivos (sustancias activas) en un medio líquido, y que se evidencia por la ausencia de crecimiento en los pozos,



utilizando al indicador redox resazurina (Anexo 2) como marcador de bacterias vivas<sup>77</sup>.

#### **a) Preparación de las muestras**

Para esta prueba, los extractos fueron diluidos en DMSO a una concentración de 100 mg/mL, posteriormente fueron preparados en diluciones dobles seriadas; obteniendo 10 diluciones doblemente concentradas finales en el rango de 3,91 – 2000 µg/mL de los extractos trabajados<sup>78</sup>.

#### **b) Bacterias y condiciones de cultivo**

Se usó cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Las bacterias fueron sembradas en placas de agar tripticasa soya e incubadas a 37°C por 18 h. Para preparar el inóculo base se resuspendieron las colonias en solución salina estéril al 0,85% y se ajusta la turbidez a la equivalente al tubo 0,5 de la escala de McFarland ( $1,5 \times 10^8$  UFC/ml).

#### **c) Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI)**

Se realizó de acuerdo al método modificado de Sarker S. et al<sup>78</sup>. Se utilizó una placa de poliestireno de 96 pozos de fondo plano y estériles (Anexo 2). Las muestras se prepararon a unas concentraciones de 3,91 – 2000 µg/mL, utilizando técnicas de dilución serial y se usó como control positivo ciprofloxacino a las concentraciones de 0,125 - 64 µg/mL, también usando técnicas de dilución serial. En este método se incluyó pozos de control de crecimiento (bacterias más caldo Mueller-Hinton), de control de esterilidad (caldo Mueller-Hinton), y los de ensayo (bacterias más caldo Mueller-Hinton

mas antibiótico o extracto). Todas las pruebas fueron hechas por triplicado. Las muestras y los antibióticos se dispensaron en los pozos de las placas de microdilución a razón de 100 uL de cada uno, a una concentración 2x de la final deseada. Luego se adicionó 100 uL del inóculo que ya tenía incorporado la solución indicadora de resazurina a cada pozo. Luego las placas fueron llevadas a incubación de 37°C por 18 -24 h<sup>78</sup>.

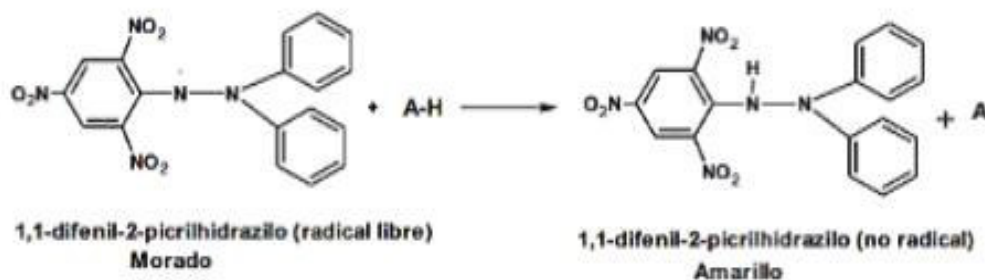
#### **d) Lectura de los resultados de la concentración mínima inhibitoria (CMI)**

La lectura de resultados se hizo visualmente. Cualquier cambio de color de púrpura a rosado o incoloro se registraron como positivos. La concentración más baja a la que no se produjo el cambio de color se tomó como el valor de la CMI. Se calculó el promedio de tres valores y se reportó como la CMI<sup>78</sup>.

### **3.10. Determinación de la actividad antioxidante**

#### **➤ Captación del radical 2,2 –difetil-1- picrilhidrazil (DPPH)**

**a) Fundamento:** La molécula 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo (DPPH) es conocida como un radical libre estable debido a la deslocalización de un electrón desapareado sobre la molécula completa que se evidencia por el color violeta intenso típico del radical, el cual se absorbe en metanol a 517 nm. Cuando la solución de DPPH reacciona con el sustrato antioxidante que dona un átomo de hidrógeno, el color violeta se desvanece. El cambio de color es monitoreado espectrofotométricamente y es utilizado para la determinación de los parámetros para las propiedades antioxidantes<sup>79, 80,81</sup>.



**Figura 13.** Estructura del DPPH antes y después de la reacción con el antioxidante<sup>79</sup>.

**b) Procedimiento:** Se preparó la solución stock de 40 mg/100 mL de 2,2 – Difenil-1-picrilhidracil (DPPH, Sigma) 1 mM en metanol y almacenado a 4°C protegido de la luz. Se calibró el espectrofotómetro con un blanco que contiene 400 µL del solvente de la muestra problema (Tabla 6) y 800 µL de metanol.

Luego se colocó en un tubo de ensayo 400 µL de cada muestra a diferentes concentraciones de 0, 50, 200, 350, 500 y 650 µg/mL, finalmente se agregó 800 µL de la solución de trabajo de DPPH y agitó.

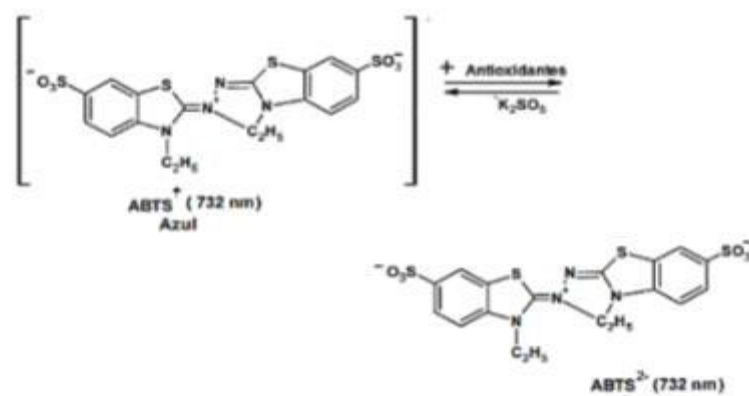
Se dejó en reposo durante 30 minutos alejado de la luz y se leyó a una longitud de onda de 517 nm. Todos los extractos fueron medidos por triplicado. Se aplicó el mismo procedimiento para la sustancia patrón Trolox, con los valores de absorbancia obtenidos se determinó el porcentaje de captación de radicales libres (DPPH \*), mediante la siguiente expresión:

$$\% \text{ Inhibicion} = \frac{(Abs. DPPH - Abs. muestra)}{Abs. DPPH} \times 100$$

El EC<sub>50</sub> se determinó a partir de la gráfica del porcentaje de inhibición en función de la concentración, y corresponde a la concentración en la que se neutraliza el 50 % de los radicales libres del DPPH.

➤ **Captación del radical ácido 2,2'-azinobis (3- etilbenzotiazolín)-6 Sulfónico (ABTS<sup>•+</sup>)**

**a) Fundamento:** El radical catiónico ABTS<sup>•+</sup> es un cromóforo de color verde azulado que se absorbe a una longitud de onda de 734 nm, este se genera por una reacción de oxidación del ABTS (2,2'-azino-bis- (3-etil benzotiazolín-6-sulfonato de amonio) con persulfato de potasio. En presencia de una sustancia captadora de radicales libres el compuesto reacciona y se decolora hacia amarillo pálido. La reducción del reactivo se evidencia espectrofotométricamente mediante la disminución de la absorbancia a 734 nm. La actividad antioxidante de una muestra se expresa en EC<sub>50</sub> (concentración mínima necesaria para inhibir al 50 % el ABTS<sup>•+</sup> 79,82.



**Figura 14.** Estructura del ABTS<sup>•+</sup> antes y después de la reacción con el antioxidante<sup>79</sup>.

**b) Procedimiento:** Se preparó el radical ABTS<sup>•+</sup> que se obtiene por la reacción de ABTS (7mM) con persulfato potásico (2.45 mM) incubados a temperatura ambiente (25°C) y en la oscuridad durante 16 horas, una vez formado el radical ABTS<sup>•+</sup> se diluyó con agua bidestilada hasta obtener un valor de absorbancia (A) de  $0.7 \pm 0.02$  a una longitud de onda de 734 nm.

Cada extracto se diluyó con 2 mL de su solvente (Tabla 6). A 20 uL de cada solución se añadieron 980 uL de la solución de ABTS<sup>•+</sup> y se midió la absorbancia del blanco y de los extractos a los 7 minutos. Todos los extractos fueron medidos por triplicado. Se aplicó el mismo procedimiento para la sustancia patrón Trolox, con los valores de absorbancia obtenidos se determinó el porcentaje de captación de radicales libres (ABTS<sup>•+</sup>) mediante la siguiente expresión:

$$\% \text{ Inhibicion} = \frac{(Abs. ABTS - Abs. muestra)}{Abs. ABTS} \times 100$$

El EC<sub>50</sub> se determinó a partir de la gráfica del porcentaje de inhibición en función de la concentración, y corresponde a la concentración en la que se neutraliza el 50 % de los radicales libres del ABTS<sup>•+</sup>.

**Tabla 6.** Solventes de las muestras utilizadas para el ensayo de DPPH Y

ABTS <sup>•+</sup>	
Extracto	Solvente
Hojas	Etanol: Metanol (4:1)
Vaina (pulpa)	Agua destilada
Semillas	Agua destilada

### 3.11. Métodos estadísticos para el análisis de los resultados

Los resultados se presentan en tablas y figuras y fueron sometidos a un Análisis de Varianza (ANOVA) y a la Prueba de Tukey para comprobar la diferencia entre las medias, se consideraron significativos valores de  $p < 0.05$

## IV. RESULTADOS

### 4.1. Estudio farmacognóstico

#### 4.1.1. Estudio fitoquímico del extracto etanólico de *Prosopis pallida* (Algarrobo)

Los resultados del estudio fitoquímico demostró que las hojas presenta abundante cantidad de compuestos fenólicos y taninos; moderada presencia de flavonoides y trazas de triterpenoides y saponinas. La vaina (pulpa) y semillas mostraron abundante cantidad de azúcares; moderada presencia de taninos y trazas de triterpenoides y alcaloides.

**Tabla 7.** Marcha fitoquímica del extracto etanólico de *Prosopis pallida*

Reactivo	Metabolitos secundarios	Resultado		
		Hojas	Vaina (pulpa)	Semillas
<b>Molish A</b>	Carbohidratos (azúcares)	-	+++	+++
<b>Antrona</b>	Carbohidratos (azúcares)	-	+++	+++
<b>FeCl<sub>3</sub></b>	Compuestos fenólicos	+++	-	-
<b>Gelatina</b>	Taninos	+++	++	++
<b>Nihidrina + calor</b>	Aminoácidos libres	-	-	-
<b>Shinoda</b>	Flavonoides, chalconas, antrona y catequinas	++	-	-
<b>Sulfato de cerio</b>	Flavonoides	++	-	-
<b>Liberman</b> <b>Buchardat</b>	Triterpenoides esteroides, antronas	+	+	+
<b>Bortranger</b>	Naftoquinonas, antraquinonas, antronas	-	-	-
<b>Dragendorff</b>	Alcaloides	-	+	+
<b>Mayer</b>	Alcaloides	-	-	-
<b>Bethrand</b>	Alcaloides	-	+	+
<b>Agua destilada</b>	Saponinas	+	-	-

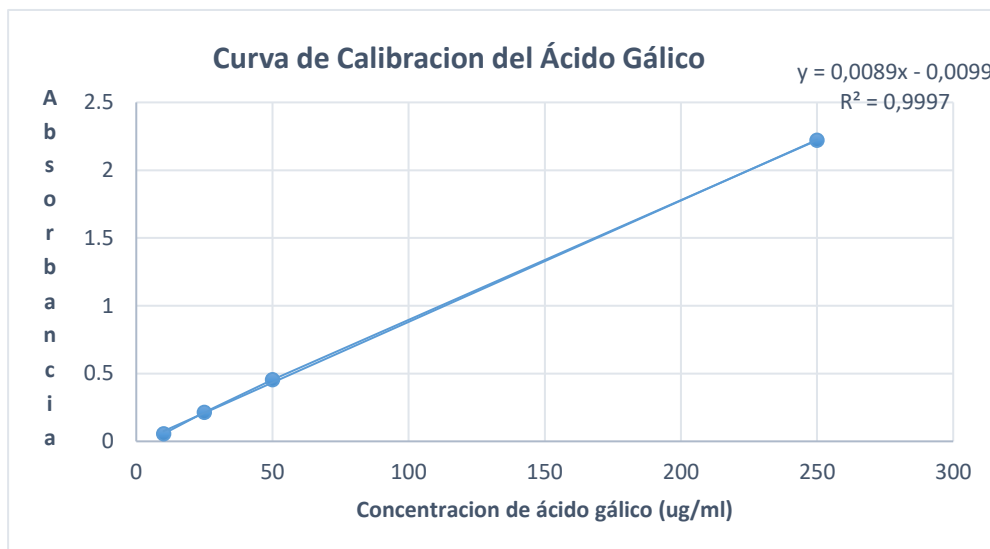
#### Leyenda:

**Muy abundante: +++++; Abundante: +++; Moderado: ++; Trazas: +;**

**Ausente: (-)**

## 4.2. Cuantificación de fenoles totales

En la figura 15 se observa la curva de calibración del ácido gálico utilizado como patrón de referencia para la cuantificación de fenoles.



**Figura 15.** Curva de calibración del ácido gálico para la determinación de fenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu

El contenido de fenoles totales en las muestras estudiadas se presenta en la tabla 8, se observó que las hojas tiene entre 4,7 y 5,87 mg/Eq ácido gálico/ g de extracto seco más que la vaina (pulpa) y las semillas de *Prosopis pallida*.

**Tabla 8.** Contenido de fenoles totales en los extractos etanólicos de las hojas, vaina (pulpa) y semillas de *Prosopis pallida*

Extracto etanólico de <i>Prosopis pallida</i>	Fenoles totales (mg/Eq ácido gálico/g extracto seco)
Hojas	8,39
Vaina (pulpa)	3,69
Semillas	2,52

### 4.3. Actividad antimicrobiana

#### 4.3.1. Método de difusión en agar

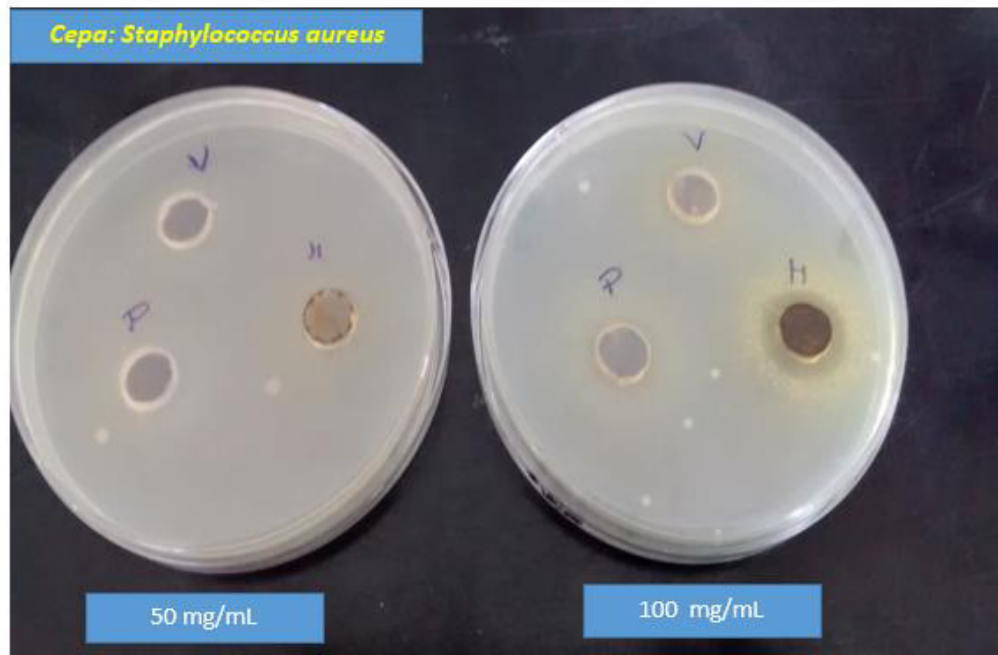
Los resultados de la determinación de la actividad antimicrobiana de los extractos en estudio por el método de difusión en agar, se presentan en la tabla 9 y en las figuras 16 al 20. En la tabla 9 y en la figura 16, se aprecia que sólo el extracto etanólico de las hojas de *Prosopis pallida* a una concentración de 100 mg/mL tiene un halo de inhibición de 18 mm, que es interpretado como actividad contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. En la misma tabla, se observa que los extractos etanólicos de la vaina (pulpa) y las semillas de *Prosopis pallida* no presentaron actividad contra las cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 y *Bacillus subtilis* ATCC 6633. En la figura 21 se observa el comportamiento del control (ciprofloxacino) frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 en comparación con los extractos etanólicos de *Prosopis pallida*.

**Tabla 9.** Actividad antibacteriana del extracto etanólico de *Prosopis pallida* (Algarrobo) por el método de difusión en agar.

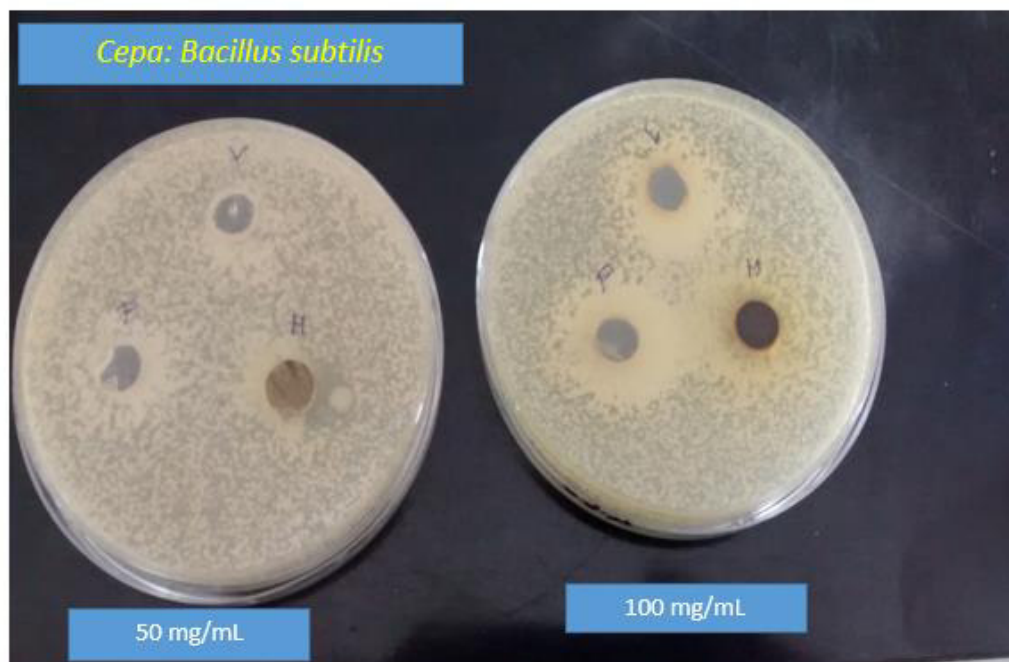
Parte Estudiada	Diámetro del halo de inhibición (mm)			
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633
<b>Hojas</b>	18	0	0	0
<b>Vaina (pulpa)</b>	0	0	0	0
<b>Semilla</b>	0	0	0	0
<b>Controles</b>				
<b>DMSO</b>	0	0	0	0
<b>Ciprofloxacino (50 µg/disco)</b>	28	45	39	41

DMSO: Dimetilsulfóxido

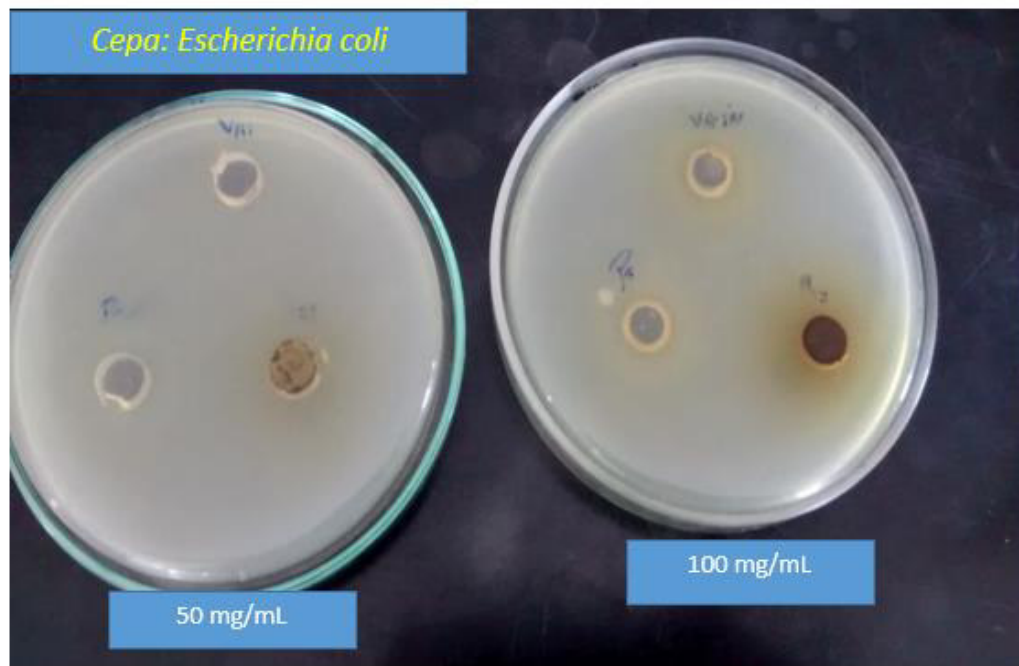




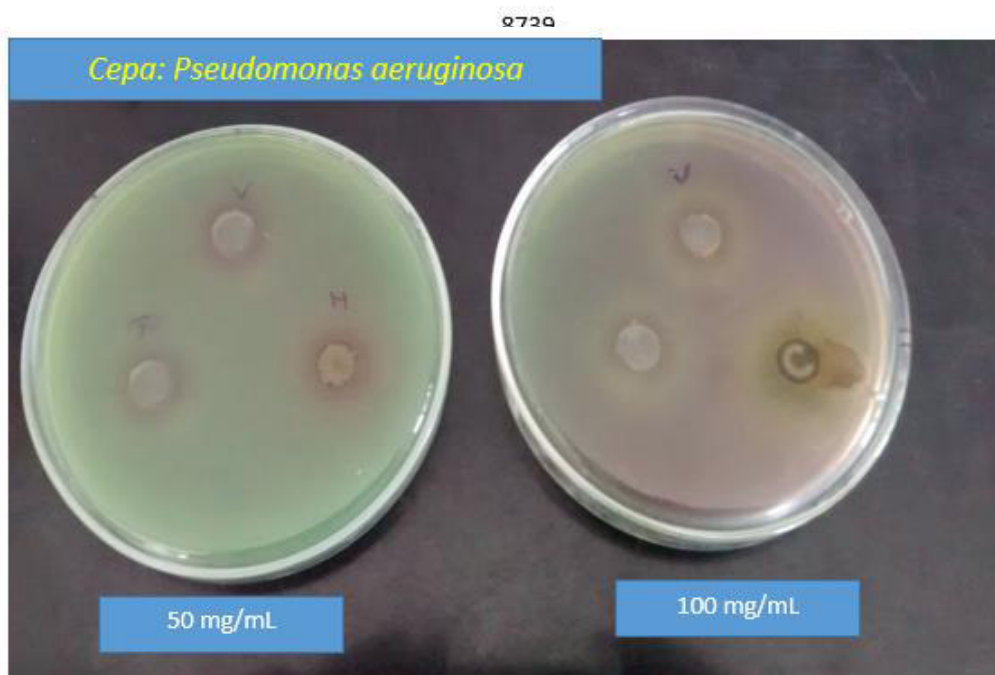
**Figura 16:** Actividad antimicrobiana de los extractos etanólicos de las hojas (H), vaina (V) y semillas (P) a 50 y 100 mg/mL por el método de difusión en agar contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.



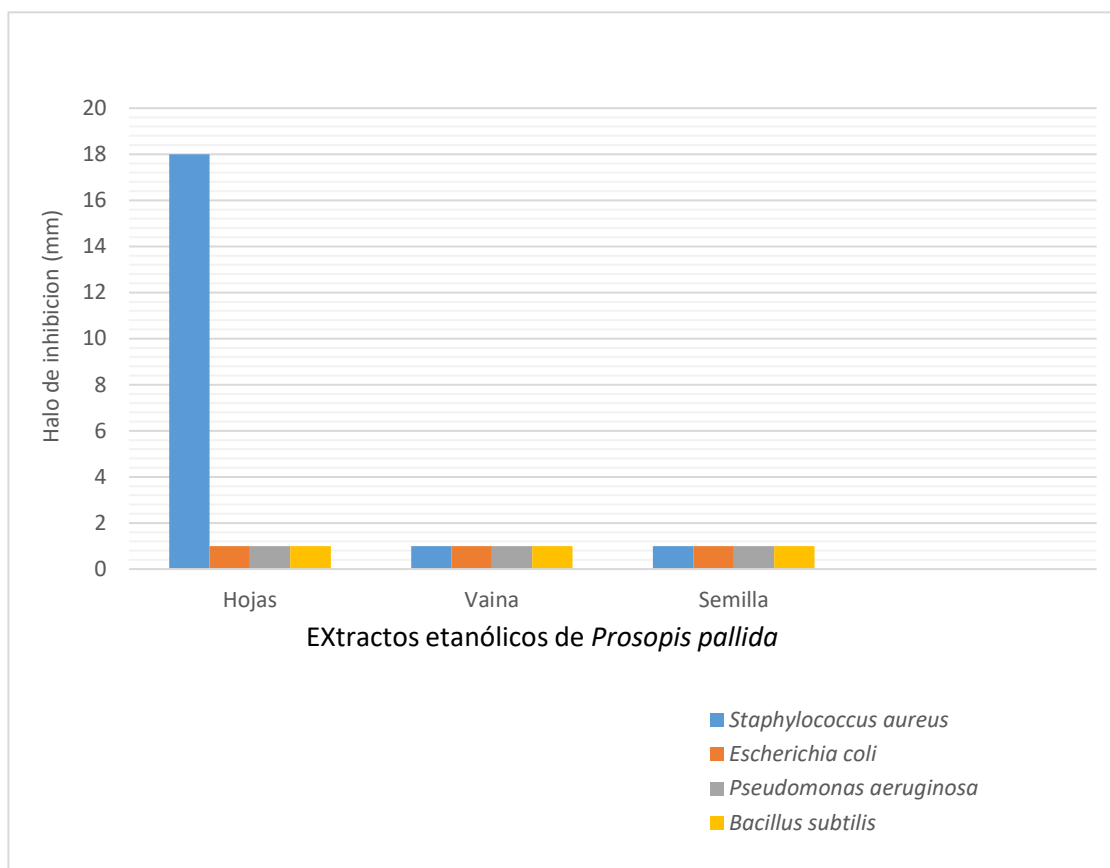
**Figura 17:** Actividad antimicrobiana de los extractos etanólicos de las hojas (H), vaina (V) y semillas (P) a 50 y 100 mg/mL por el método de difusión en agar contra *Bacillus subtilis* ATCC 6633.



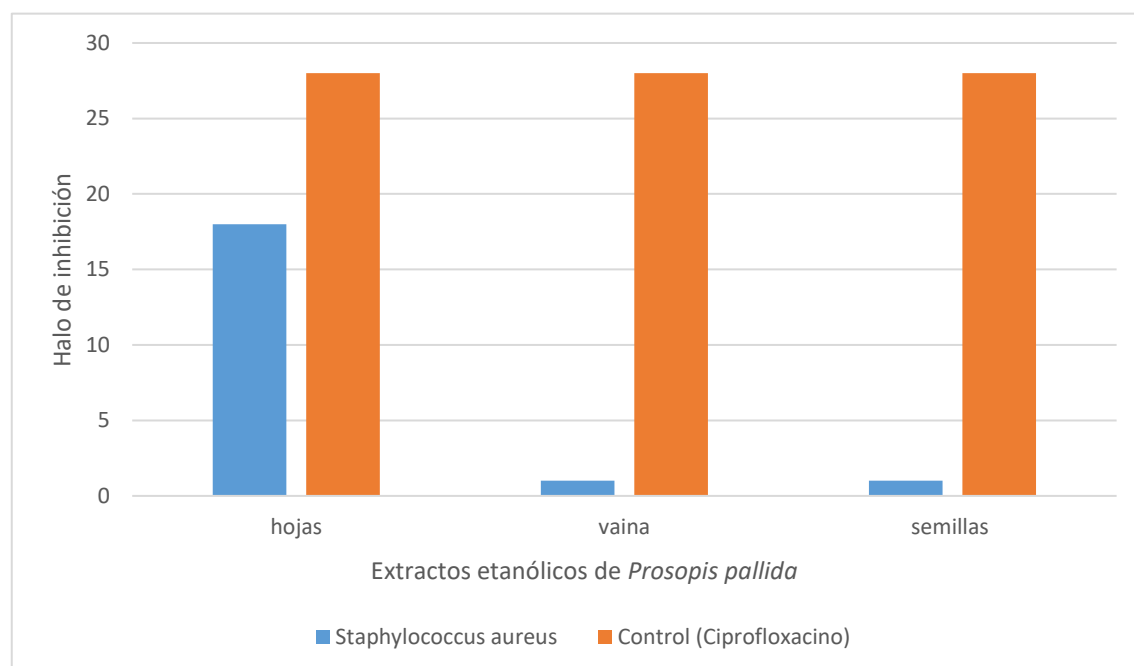
**Figura 18:** Actividad antimicrobiana de los extractos etanólicos de las hojas (H), vaina (V) y semillas (P) a 50 y 100 mg/mL por el método de difusión en agar contra *Escherichia coli* ATCC



**Figura 19:** Actividad antimicrobiana de los extractos etanólicos de las hojas (H), vaina (V) y semillas (P) a 50 y 100 mg/mL por el método de difusión en agar contra *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.



**Figura 20.** Determinación de la actividad antimicrobiana por el método de difusión en agar



**Figura 21.** Halo de inhibición de los extractos etanólicos de *Prosopis pallida* y Ciprofloxacino (control) frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

#### 4.3.2. CMI por el método de microdilución colorimétrico de microplaca

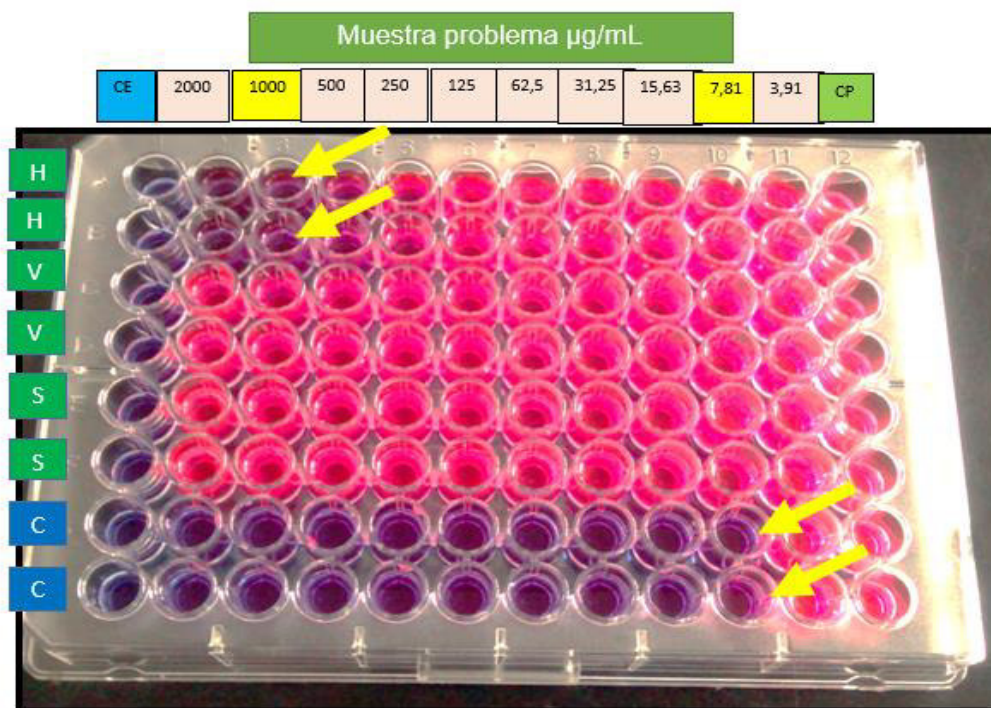
Los resultados de la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) por el método de microdilución colorimétrica de los extractos en estudio se presentan en la tabla 10 y las figuras 22 al 26. En la tabla 10 y las figuras 22 y 23 se observa que sólo el extracto etanólico de las hojas de *Prosopis pallida* tiene una CMI =1000 µg/mL contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y un CMI=62,5 µg/mL contra *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228.

En las figura 24, 25 y 26 se observa que los extractos etanólicos de la vaina (pulpa) y semilla de *Prosopis pallida* (algarrobo) no presentan actividad a la concentración de  $\leq 2000$  µg/mL contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Escherichia coli* ATCC 8731, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

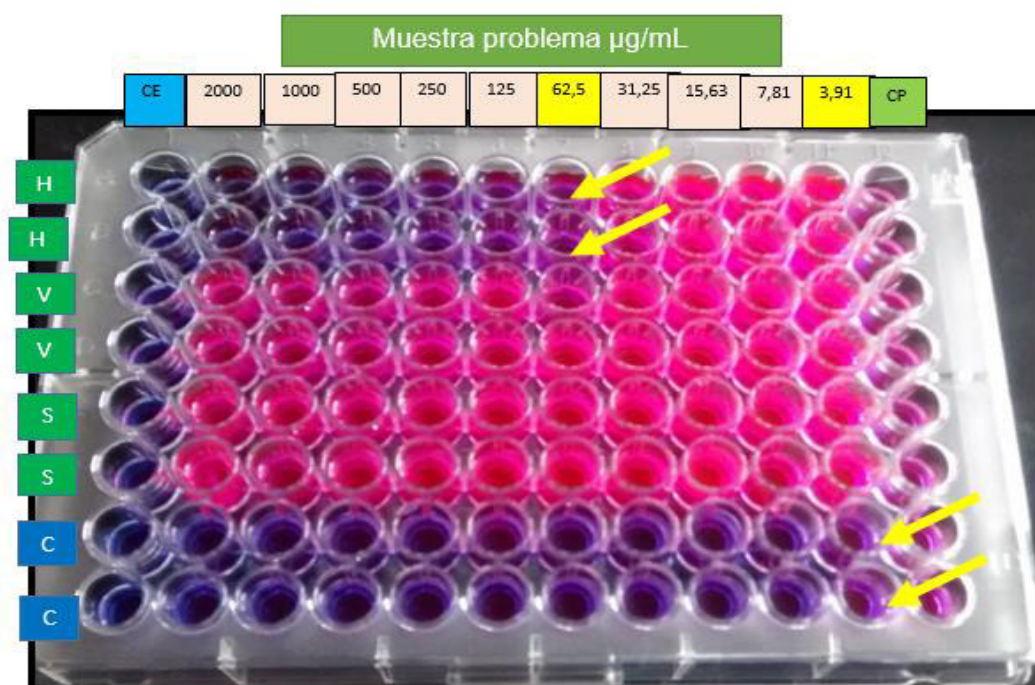
**Tabla 10.** Valores de la concentración mínima inhibitoria de *Prosopis pallida* (Algarrobo) sobre *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* y *Pseudomonas aeruginosa*.

Parte de la planta estudiada	Concentración Mínima Inhibitoria (µg/mL)				
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	<i>Escherichia coli</i> ATCC 8731	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853
Hojas	1000	62,5	>2000	>2000	>2000
Vaina	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000
Semilla	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000
Control Ciprofloxacino	1	0,125	0,125	0,25	8





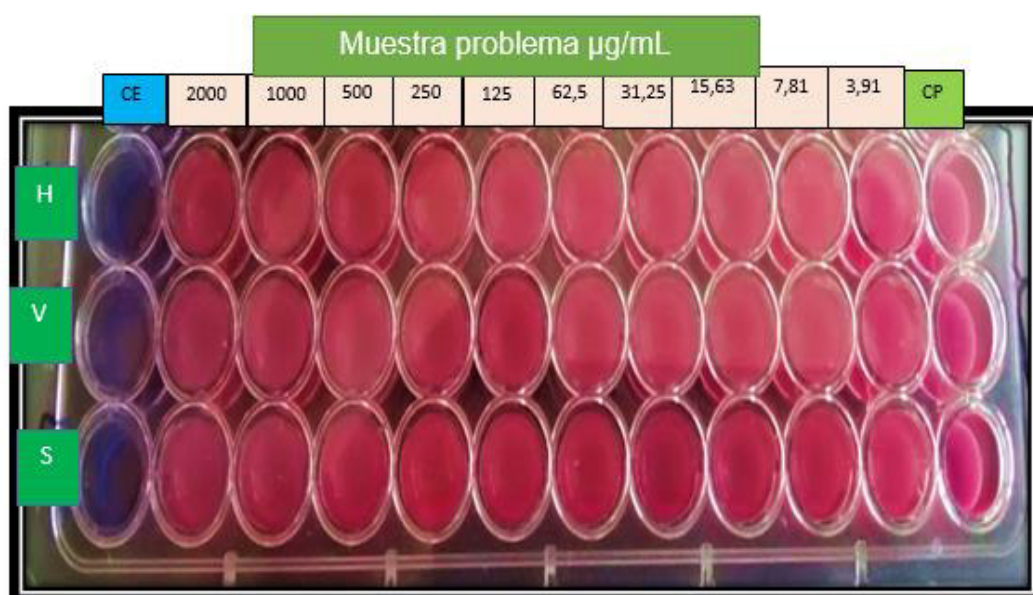
**Figura 22.** Determinación de la concentración mínima inhibitoria de los extractos etanólicos de las hojas (H), vaina (pulpa) (V) y semillas (S) de *Prosopis pallida* por el método de microdilución colorimétrica en microplaca contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Donde CE= Control de esterilidad y CP=Control positivo.



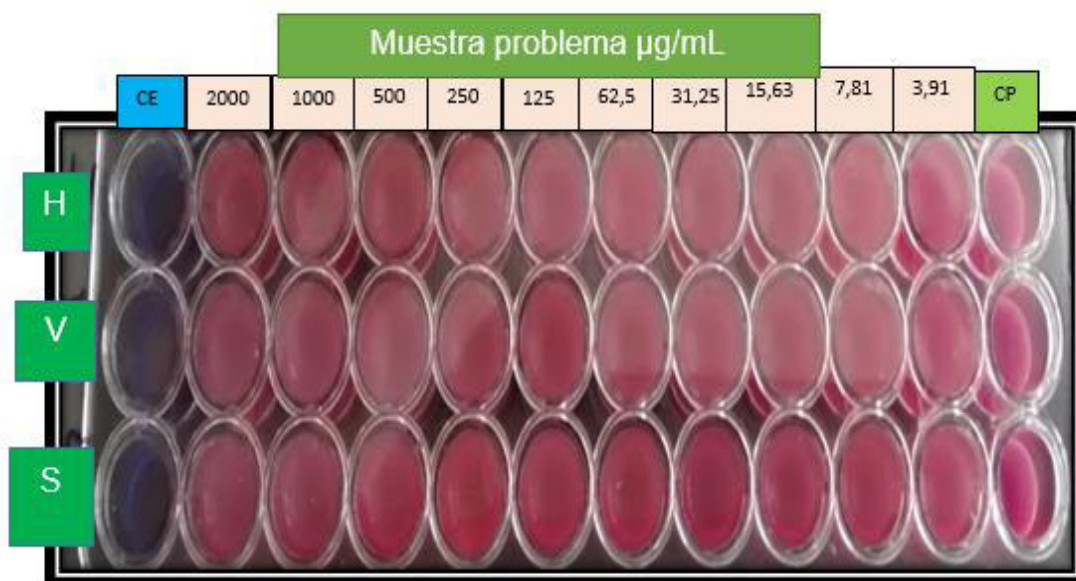
**Figura 23.** Determinación de la concentración mínima inhibitoria de los extractos etanólicos de las hojas (H), vaina (pulpa) (V) y semillas (S) de *Prosopis pallida* por el método de microdilución colorimétrica en microplaca contra *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228. Donde CE= Control de esterilidad y CP=Control positivo.



**Figura 24.** Determinación de la concentración mínima inhibitoria de los extractos etanólicos de las hojas (H), vaina (pulpa) (V) y semillas (S) de *Prosopis pallida* por el método de microdilución colorimétrica en microplaca contra *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Donde CE= Control de esterilidad y CP=Control positivo.



**Figura 25.** Determinación de la concentración mínima inhibitoria de los extractos etanólicos de las hojas (H), vaina (pulpa) (V) y semillas (S) de *Prosopis pallida* por el método de microdilución colorimétrica en microplaca contra *Escherichia coli*. ATCC 8731. Donde CE= Control de esterilidad y CP=Control positivo.



**Figura 26.** Determinación de la concentración mínima inhibitoria de los extractos etanólicos de las hojas (H), vaina (pulpa) (V) y semillas (S) de *Prosopis pallida* por el método de microdilución colorimétrica contra *Bacillus subtilis* ATCC 6633. Donde CE= Control de esterilidad y CP=Control positivo.



#### 4.4. Actividad Antioxidante

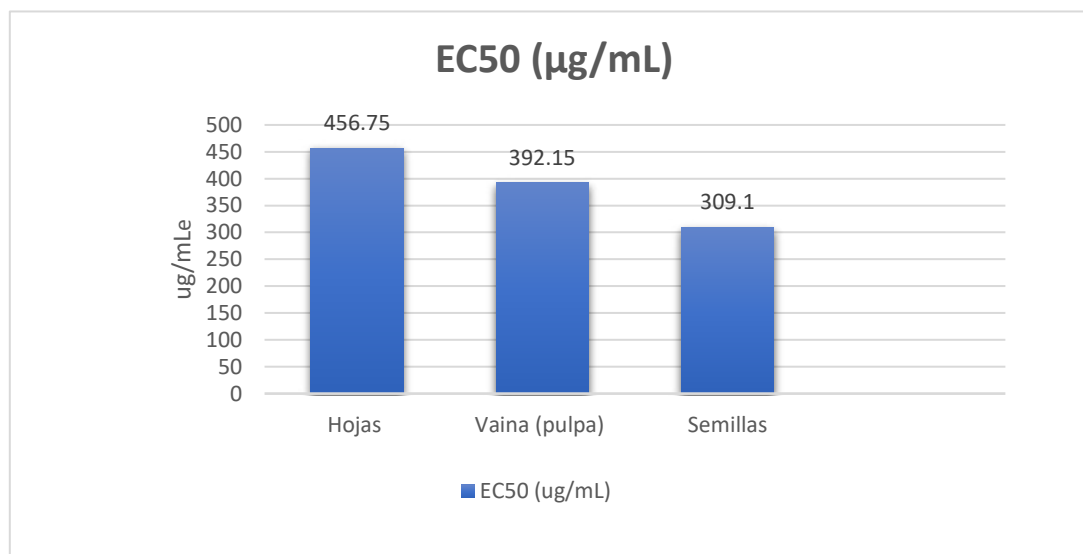
➤ **Método DPPH: extracto etanólico de *Prosopis pallida* (Algarrobo)**

Como se puede observar en la tabla 11 los extractos etanólicos de la vaina (pulpa) y semillas mostraron valores cercanos en los porcentajes de captación del radical libre DPPH en las concentraciones de 50, 200 y 350 µg/mL.

**Tabla 11.** Porcentaje de captación de radicales libres por el método DPPH

Concentración (µg/mL)	% Captación de radicales libres de <i>Prosopis pallida</i>		
	Hojas	Vaina (pulpa)	Semillas
50	8,23	16,60	14,70
200	31,19	37,64	38,28
350	50,43	52,17	57,06
500	73,25	66,15	78,49
650	81,16	74,32	87,53

En la figura 27 se observa los valores del EC<sub>50</sub> de los tres extractos estudiados, mostrando una mayor actividad antioxidante el extracto etanólico de las semillas



**Figura 27.** Determinación de la concentración efectiva media (EC<sub>50</sub>) de *Prosopis pallida* por el método de DPPH.

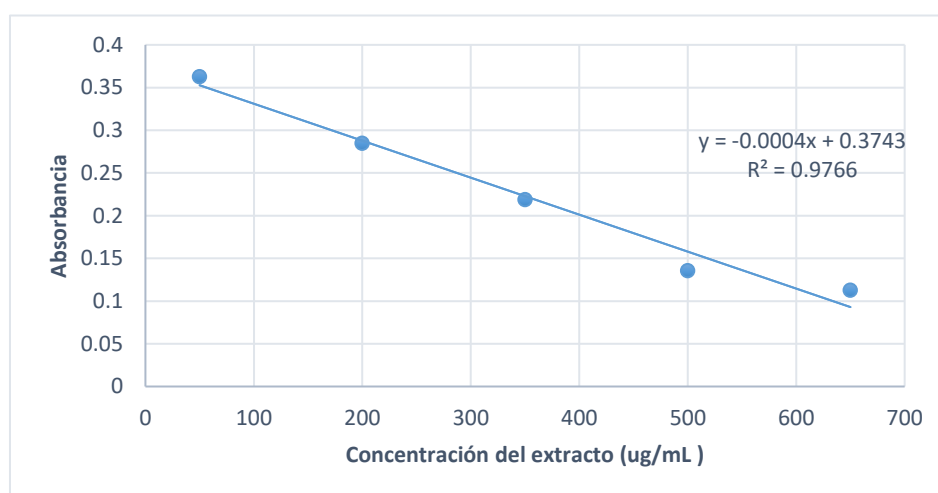


En la tabla 12 se presentan los resultados del ensayo de la actividad antioxidante por DPPH para el extracto etanólico de las hojas de *Prosopis pallida*, mostrando un EC<sub>50</sub> de 456,75 µg/mL

**Tabla 12.** Resultados de las actividad antioxidante del extracto etanólico de las hojas de *Prosopis pallida* por el método de DPPH

Sustancia antioxidante Extracto de Algarrobo (µg/mL)	Promedio Absorbancia a 517 nm (*)	DPPH (% inhibición)
0	0.383 (a)	0
50	0.363 (b)	8.23
200	0.285 (c)	31.19
350	0.219 (d)	50.43
500	0.136 (e)	73.25
650	0.113 (f)	81.16
EC50 (ug/mL)		456.75

\*Las letras distintas en las columnas indica diferencias estadísticamente significativas usando el método de Tukey con un nivel de confianza al 95%. (P≤0.05)



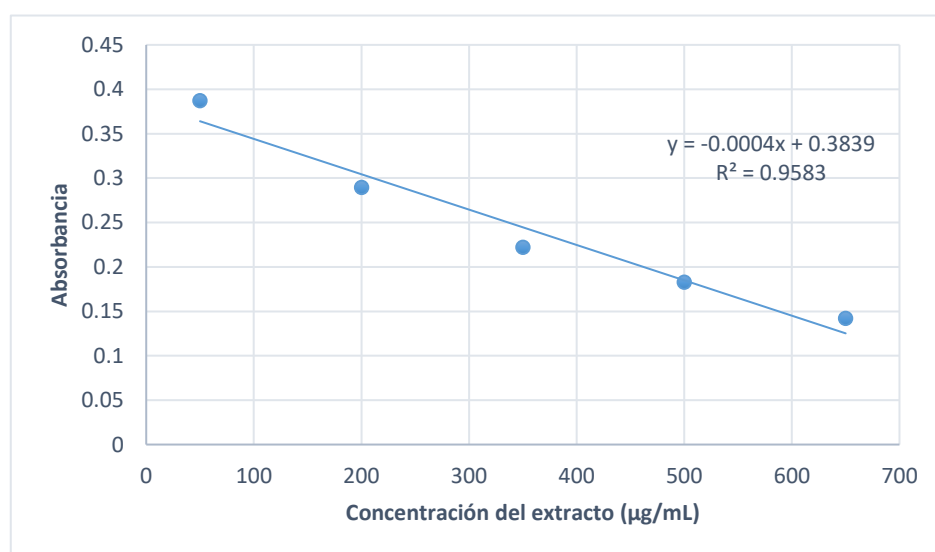
**Figura 28.** Correlación entre las concentraciones del extracto etanólico de las hojas de *Prosopis pallida* vs absorbancia.

En la tabla 13 se presentan los resultados del ensayo de la actividad antioxidante por DPPH para el extracto etanólico de la vaina (pulpa) de *Prosopis pallida*, mostrando un EC<sub>50</sub> de 392,15 µg/mL

**Tabla 13.** Resultados de las actividad antioxidante del extracto etanólico de la vaina (pulpa) de *Prosopis pallida* por el método de DPPH

Sustancia antioxidante Extracto de la vaina de Algarrobo (µg/mL)	Promedio Absorbancia a 517 nm (*)	DPPH (% inhibición)
0	0.464 (a)	0
50	0.387 (b)	16.60
200	0.289 (c)	37.64
350	0.222 (d)	52.17
500	0.157 (e)	66.15
650	0.119 (f)	74.32
EC <sub>50</sub> (µg/mL)		392.15

\*Las letras distintas en las columnas indica diferencias estadísticamente significativas usando el método de Tukey con un nivel de confianza al 95%. (P≤0.05)



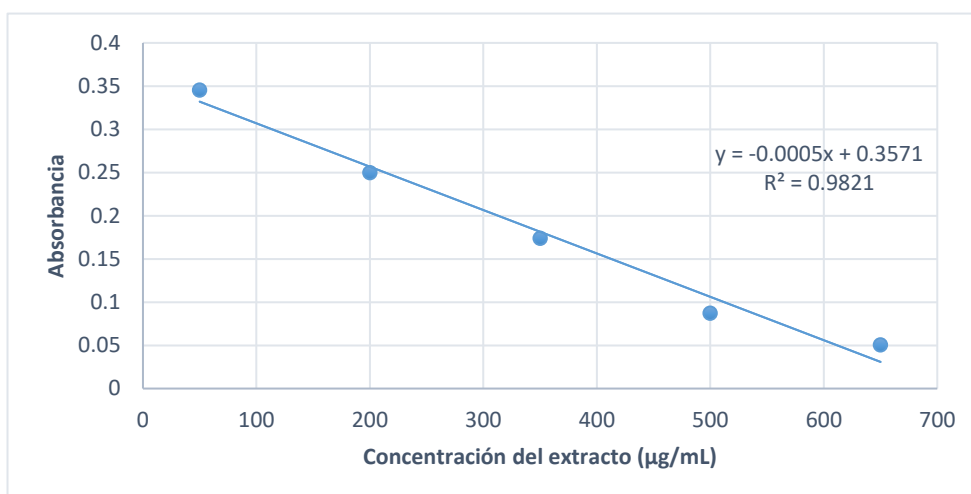
**Figura 29.** Correlación entre las concentraciones del extracto etanólico de la vaina (pulpa) de *Prosopis pallida* vs absorbancia

En la tabla 14 se presentan los resultados del ensayo de la actividad antioxidante por DPPH para el extracto etanólico de las semillas de *Prosopis pallida*, mostrando un EC<sub>50</sub> de 309,10 µg/mL

**Tabla 14.** Resultados de las actividad antioxidante del extracto etanólico de las semillas de *Prosopis pallida* por el método de DPPH

Sustancia antioxidante Extracto de Algarrobo (µg/mL)	Promedio Absorbancia a 517 nm (*)	DPPH (% inhibición)
0	0.4051 (a)	0
50	0.345 (b)	14.70
200	0.250 (c)	38.28
350	0.174 (d)	57.06
500	0.087 (e)	78.49
650	0.051 (f)	87.53
EC50 (µg/mL)		309.10

\*Las letras distintas en las columnas indica diferencias estadísticamente significativas usando el método de Tukey con un nivel de confianza al 95%. (P≤0.05)



**Figura 30.** Correlación entre las concentraciones del extracto etanólico de las semillas de *Prosopis pallida* vs absorbancia

➤ **Método DPPH: solución patrón Trolox**

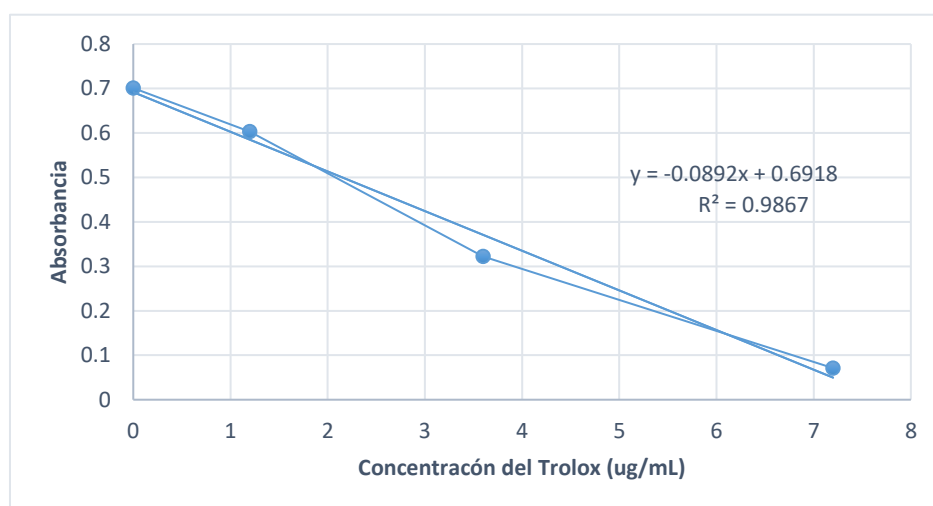
En la tabla 15 se presentan los resultados del ensayo de la actividad antioxidante por DPPH para la solución patrón Trolox presentando un EC<sub>50</sub> de 3,8 µg/mL.

**Tabla 15.** Resultados de la actividad antioxidante de trolox por el método DPPH

Sustancia antioxidante Trolox (µg/mL)	Promedio Absorbancia a 517 nm (*)	DPPH (% inhibición)
0	0.701 (a)	0
1.2	0.603 (b)	14.03
3.6	0.322 (c)	54.00
7.2	0.071 (d)	89.90
10 *	0.059 (e)	91.55
EC50 (µg/mL)		3.8

\*Las letras distintas en las columnas indican diferencia significativa entre las medias usando el método de Tukey con un nivel de confianza al 95%. ( $P \leq 0.05$ )

\*El resultado de la muestra a concentración de 10 ug/mL no se consideró para la realización de la gráfica ni para el EC<sub>50</sub>.



**Figura 31.** Correlación entre las concentraciones de la solución patrón Trolox vs absorbancia

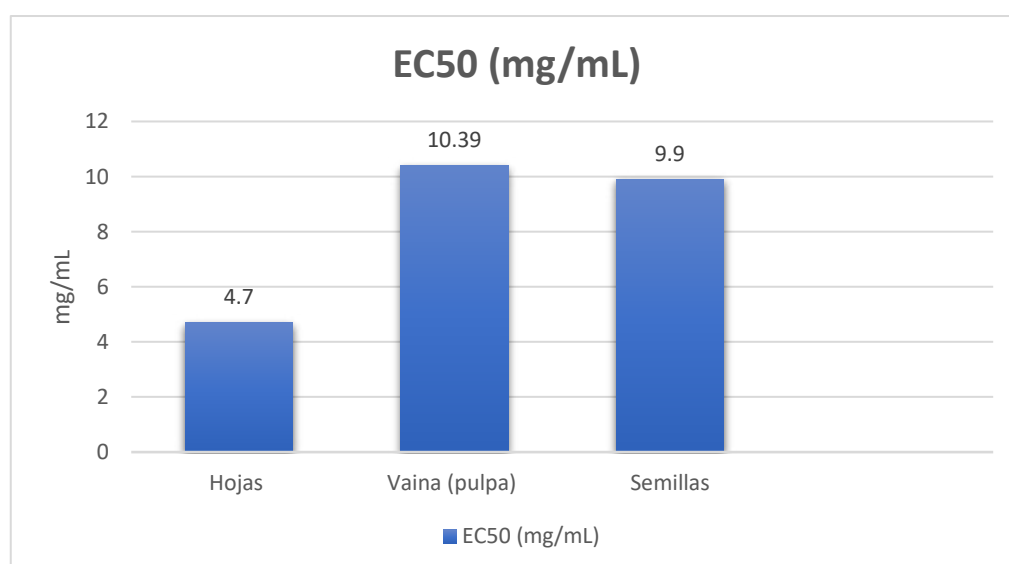
➤ **Método ABTS<sup>•+</sup> : extracto etanólico de *Prosopis pallida* (Algarrobo)**

Como se puede observar en la tabla 16, el extracto etanólico de las hojas de *Prosopis pallida* presenta mayores porcentajes de captación del radical libre ABTS<sup>•+</sup> en las distintas concentraciones estudiadas.

**Tabla 16.** Porcentaje de captación de radicales libres por el método ABTS<sup>•+</sup>

Concentración (mg/mL)	% Captación de radicales libres de <i>Prosopis pallida</i>		
	Hojas	Vaina (pulpa)	Semillas
0.55	11.02	6.61	4.76
2.5	37.83	17.62	19.82
4	46.18	28.90	25.79
5	55.49	30.45	26.94
7	63.92	34.07	33.56

En la figura 32 se observa los valores del EC<sub>50</sub> de los tres extractos estudiados, mostrando una mayor actividad antioxidante el extracto etanólico de las hojas.



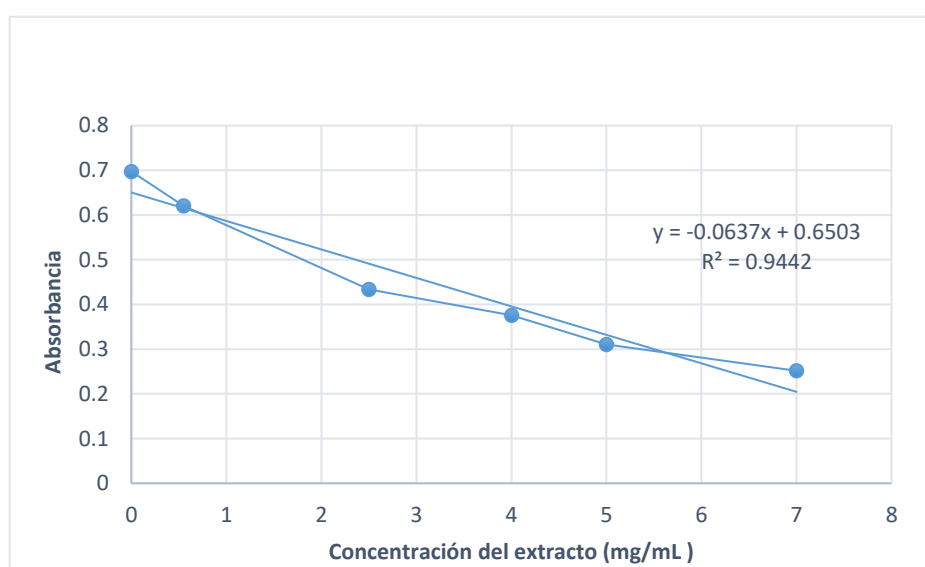
**Figura 32.** Determinación de la concentración efectiva media (EC<sub>50</sub>) de *Prosopis pallida* por el método ABTS<sup>•+</sup>.

En la tabla 17 se presentan los resultados del ensayo de la actividad antioxidante por ABTS<sup>•+</sup> para el extracto etanólico de las hojas de *Prosopis pallida*, mostrando un EC<sub>50</sub> de 4,7 mg/mL

**Tabla 17.** Resultados de la actividad antioxidante de extracto etanólico de las hojas de *Prosopis pallida* por el método de ABTS<sup>•+</sup>.

Sustancia antioxidante Extracto de Algarrobo (mg/mL)	Promedio Absorbancia a 734 nm (*)	ABTS <sup>•+</sup> (% inhibición)
0	0.691 (a)	0
0.55	0.621 (b)	11.02
2.5	0.434 (c)	37.83
4	0.375 (d)	46.18
5	0.310 (e)	55.49
7	0.252 (f)	63.92
EC50 (mg/mL)		4.7

\*Las letras distintas en las columnas indican diferencia significativa entre las medias usando el método de Tukey con un nivel de confianza al 95%. (P≤0.05)



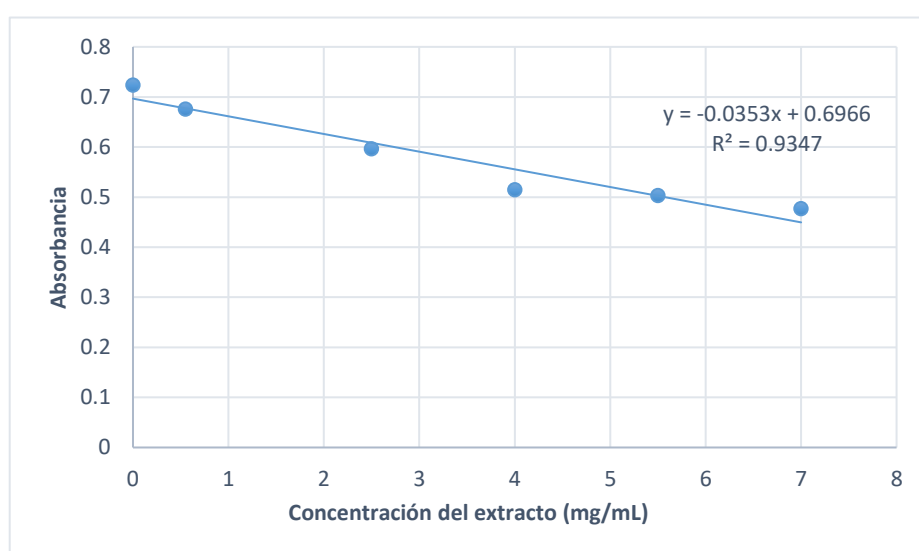
**Figura 33.** Correlación entre las concentraciones del extracto etanólico de las hojas de *Prosopis pallida* vs absorbancia.

En la tabla 18 se presentan los resultados del ensayo de la actividad antioxidante por ABTS<sup>•+</sup> para el extracto etanólico de la vaina (pulpa) de *Prosopis pallida*, mostrando un EC<sub>50</sub> de 10,39 mg/mL

**Tabla 18.** Resultados de la actividad antioxidante de extracto etanólico de la vaina (pulpa) de *Prosopis pallida* por el método de ABTS<sup>•+</sup>

Sustancia antioxidante Extracto de Algarrobo (mg/mL)	Promedio Absorbancia a 734 nm (*)	ABTS <sup>•+</sup> (% inhibición)
0	0.723 (a)	0
0.55	0.676 (b)	6.61
2.5	0.596 (c)	17.62
4	0.514 (d)	28.90
5	0.503 (e)	30.45
7	0.477 (f)	34.07
EC50 (mg/mL)		10.39

\*Las letras distintas en las columnas indican diferencia significativa entre las medias usando el método de Tukey con un nivel de confianza al 95%. ( $P \leq 0.05$ )



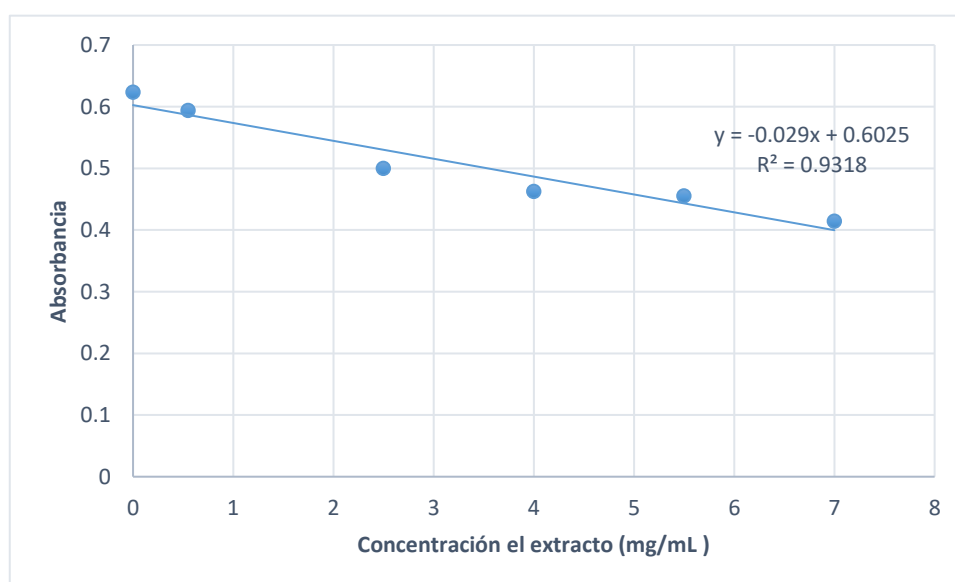
**Figura 34.** Correlación entre las concentraciones del extracto etanólico de la vaina (pulpa) de *Prosopis pallida* vs absorbancia.

En la tabla 19 se presentan los resultados del ensayo de la actividad antioxidante por ABTS<sup>•+</sup> para el extracto etanólico de las semillas de *Prosopis pallida*, mostrando un EC<sub>50</sub> de 9,90 mg/mL

**Tabla 19.** Resultados de la actividad antioxidante de extracto etanólico de las semillas de *Prosopis pallida* por el método de ABTS<sup>•+</sup>

Sustancia antioxidante Extracto de Algarrobo (mg/mL)	Promedio Absorbancia a 734 nm (*)	ABTS <sup>•+</sup> (% inhibición)
0	0.623 (a)	0
0.55	0.594 (b)	4.76
2.5	0.499 (c)	19.82
4	0.463 (d)	25.79
5	0.455 (e)	26.94
7	0.414 (f)	33.56
EC50 (mg/mL)		9.90

\*Las letras distintas en las columnas indican diferencia significativa entre las medias usando el método de Tukey con un nivel de confianza al 95%. (P≤0.05)



**Figura 35.** Correlación entre las concentraciones del extracto etanólico de las semillas de *Prosopis pallida* vs absorbancia.



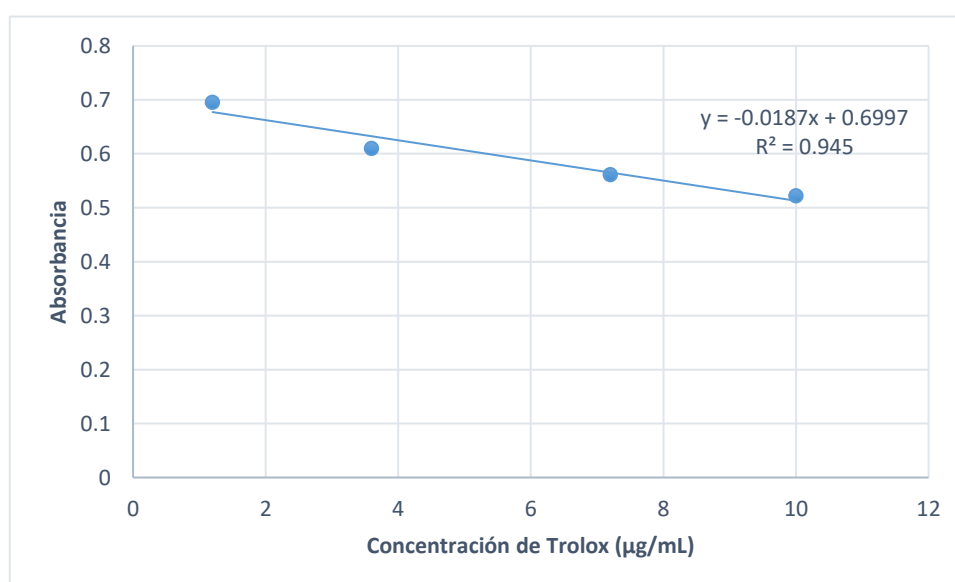
➤ **Método ABTS•+ : solución patrón Trolox**

En la tabla 20 se presentan los resultados del ensayo de la actividad antioxidante por ATBS para la solución patrón Trolox<sup>®</sup>, mostrando un EC<sub>50</sub> de 17,04 µg/mL.

**Tabla 20.** Resultados de la actividad antioxidante de Trolox<sup>®</sup> por el método de ABTS •+

Sustancia antioxidante Solución patrón Trolox (µg/mL)	Promedio Absorbancia a 734 nm (*)	ABTS•+ (% inhibición)
0	0.695	0
1.2	0.610	12.14
3.6	0.561	19.20
7.2	0.522	24.78
10	0.457	34.23
EC50 (µg/mL)		17.04

\*Las letras distintas en las columnas indican diferencia significativa entre las medias usando el método de Tukey con un nivel de confianza al 95%. (P≤0.05).



**Figura 36.** Correlación entre las concentraciones de la solución patrón Trolox vs absorbancia del radical ABTS•+

## V. DISCUSIÓN

En el estudio fitoquímico de los extractos etanólicos de *Prosopis pallida*, el extracto de las hojas (Tabla 7) evidenció compuestos como: fenoles, taninos y flavonoides; diversos estudios señalan la presencia de polifenoles, flavonoides y taninos en la misma especie, estos últimos en un porcentaje de 0.8% a 2.0%<sup>3</sup>. En el ensayo no se observó la presencia de alcaloides, sin embargo Zamacona y Castro (2010) reportan presencia de alcaloides para el extracto etanólico de las hojas de *Prosopis pallida*<sup>70</sup>.

En el extracto de la vaina (pulpa) de *P. pallida* se evidenció la presencia de azúcares, taninos y alcaloides; similar hallazgo reportó Cruz (1987) en su estudio de la composición de la pulpa (Tabla 1), reportando un contenido de 48,5 g /100g de azúcares solubles totales (sacarosa, fructosa, glucosa, xilosa) y de taninos condensados de 0,41 g/100g<sup>21</sup>. Para el extracto de las semillas se observó también la presencia de azúcares y alcaloides.

La actividad antimicrobiana de los extractos etanólicos de las hojas, vaina (pulpa) y semillas de *Prosopis pallida* por el método de difusión en agar, demostraron que sólo el extracto etanólico de las hojas de *Prosopis pallida* presentó actividad antibacteriana (halo de inhibición = 18 mm) frente a la cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 a la concentración de 100 mg/mL, dicho resultado es similar al reportado por Bussman R. et al (2011) que evidenció un valor de 15 mm de halo de inhibición para el extracto etanólico de las hojas de *Prosopis pallida*<sup>2</sup>. Este resultado también puede equipararse al encontrado para el extracto etanólico de las hojas de *Prosopis juliflora* activo contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 con un halo de inhibición de 12,72 + 0,67 mm a una concentración de 100mg/mL mediante el método de difusión

en disco<sup>83</sup>. En el caso de los extractos etanólicos de la vaina (pulpa) y de la semilla no mostraron efecto alguno contra los microorganismos trabajados.

Se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) por el método de microdilución colorimétrica en microplaca, el extracto etanólico de las hojas de *Prosopis pallida* presentó un CMI = 1000 µg/mL frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y un CMI = 62,5 µg/mL para *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228; siendo este el primer reporte sobre esta actividad. Por otra parte los extractos etanólicos de la vaina (pulpa) y semilla de *Prosopis pallida* no presentaron actividad a una concentración  $\leq 2000$  µg/mL para los microorganismos ensayados. En un estudio realizado al extracto de semillas (10% agua, 60% metanol, 30% acetato de etilo) de *Prosopis juliflora* presentaron actividad contra *Staphylococcus aureus* (CMI = 312 mg/mL), *Staphylococcus epidermis* (CMI = 78 mg/mL), *Escherichia coli* (CMI = 1250 mg/mL) y *Pseudomonas aeruginosa* (CMI = 1250 mg/mL)<sup>84</sup>. La diferencia entre estos resultados puede deberse a ciertos factores como posibles diferencias en las especies de las plantas, los disolventes utilizados, la ubicación geográfica; además de la presencia de compuestos activos en cada una de las especies.

La actividad antimicrobiana del extracto etanólico de las hojas de *Prosopis pallida* puede atribuirse a la presencia de polifenoles, flavonoides y taninos que se pudieron observar en el análisis fitoquímico preliminar. Los mecanismos que se creen responsables de la toxicidad fenólica a microorganismos incluyen inhibición de la enzima beta-glucano sintasa por los compuestos oxidados, posiblemente a través de la reacción con grupos sulfhidrilo o a través de interacciones no específicas con las proteínas<sup>52</sup>.

Además se observó una susceptibilidad del extracto por las bacterias Grampositivas, la ausencia de sensibilidad por las bacterias gramnegativas, según estudios podría estar asociada con su membrana exterior y las moléculas de lipopolisacárido que proporcionan una barrera contra la fácil penetración de algunas moléculas antimicrobianas, las bacterias grampositivas no tienen este tipo de membrana externa<sup>84</sup>.

El método de difusión en agar es ampliamente utilizado para evaluar la actividad de extractos antimicrobianos, este método es cualitativo y está diseñado específicamente para bacterias de crecimiento rápido como los *Staphylococcus sp* y los integrantes de la familia *Enterobacteriaceae*, lo que permitió tener un amplio panorama para determinar el comportamiento de los extractos frente a los diferentes microorganismos estudiados<sup>85</sup>. El método de microdilución en placa permitió determinar los valores de CMI, este método tiene los estándares más reconocidos proporcionados por el CLSI (Clinical Laboratory Standards Institute) y el Comité Europeo de Pruebas de Susceptibilidad Antimicrobiana (EUCAST), estas directrices proporcionan un procedimiento uniforme para la prueba para llevar a cabo en la mayoría de los laboratorios de microbiología clínica. Por lo tanto, la reproducibilidad, la economía de los reactivos y el espacio que se produce debido a la miniaturización de la prueba son las principales ventajas de este método de microdilución<sup>86</sup>. No obstante, es conocido que el tamaño del inóculo, el tipo de medio de crecimiento, el tiempo de incubación y el método de preparación del inóculo puede influir en los valores de CMI<sup>78,86</sup>.

Se determinó la actividad antioxidante del extracto etanólico de la vaina (pulpa) y semillas mediante DPPH reportando un  $EC_{50}$  de 392,15  $\mu\text{g/mL}$  y 309,10  $\mu\text{g/mL}$ ; para el ensayo con  $ABTS^{++}$  presentaron un  $EC_{50}$  de 10,39  $\text{mg/mL}$  y 9,90  $\text{mg/mL}$  respectivamente. Los resultados obtenidos de ambos extractos son similares entre sí en los dos métodos realizados, se puede asumir que muchos de los compuestos fenólicos en la vaina (pulpa) podrían ser similares a los presentes en las semillas. El ensayo de contenido de fenoles por el método de Folin-Ciocalteu (tabla 8) para la vaina (pulpa) y semillas reportaron un contenido de 3,69  $\text{mg EAG/g}$  de extracto seco y 2,52  $\text{mg EAG/g}$  de extracto seco respectivamente, este resultado puede equipararse con lo expuesto por Poudineh et al. (2015) que reportó un contenido de fenoles para la vaina (pulpa) y semillas de *Prosopis farcta* de 40,56  $\text{mg EAG/g}$  de extracto seco y 34,38  $\text{mg EAG/g}$  de extracto seco respectivamente<sup>87</sup>, en ambas especies se observa que la cantidad de polifenoles entre la vaina (pulpa) y las semillas son cercanas, esa pequeña diferencia puede atribuirse a algunos compuestos fenólicos que podrán hallarse sólo en alguna de las dos muestras; como es el caso de *Prosopis farcta* que presenta al flavonoide Vitexina el cual se encuentra en la vaina y no en las semillas de la especie<sup>87</sup>. La actividad antioxidante de la vaina (pulpa) y semillas de *Prosopis pallida* se podría atribuir a la presencia de taninos que se observaron en el análisis fitoquímico.

La actividad antioxidante del extracto etanólico de las hojas de *Prosopis pallida* mediante DPPH reportó un  $EC_{50}$  de 456,75  $\mu\text{g/mL}$  y para el ensayo con  $ABTS^{++}$  presentó un  $EC_{50}$  de 4,7  $\text{mg/mL}$ . En la tabla 16 se puede observar que el extracto etanólico de las hojas posee una mejor actividad antioxidante

en relación a los otros dos extractos, esto se equipara con la cantidad de fenoles totales que presenta las hojas 8,39 mgEAG/g de extracto seco (Tabla 8). Esta actividad, podría deberse a la gran concentración de compuestos fenólicos que presenta como: fenoles, taninos y flavonoides. Importante mencionar que sólo las hojas dieron positivo en la reacción de Shinoda y con el reactivo de sulfato de cerio, ambas para identificar la presencia de flavonoides. La reacción con el reactivo de sulfato de cerio se realizó utilizando como técnica la cromatografía en capa fina, donde el patrón fue la quercetina, presentando tanto la muestra como el estándar un Rf: 0.83. El uso de quercetina como patrón se debió a que este es un flavonoide ampliamente distribuido en el reino vegetal presente naturalmente en vegetales, frutas, bebidas no alcohólicas y plantas medicinales y su capacidad antioxidante medida como Trolox es de 4.7 mM, lo que equivale a 5 veces mayor al demostrado por las vitaminas E y C, asimismo, la quercetina ha demostrado inhibir in vitro la oxidación de la lipoproteína de baja densidad (LDL) por los macrófagos y reducir la citotoxicidad de la LDL oxidada<sup>88</sup>.

Es de resaltar que sólo el extracto etanólico de las hojas de *Prosopis pallida* presentó actividades antimicrobiana y antioxidante, la presencia de compuestos fenólicos, flavonoides y taninos actuarían como responsables de dichas actividades. Asimismo, queda abierta la posibilidad de realizar estudios que establezcan su composición química para que garantice su uso terapéutico.

## VI. CONCLUSIONES

- En la marcha fitoquímica del extracto etanólico de *Prosopis pallida*, se evidenció mayor presencia de taninos en las hojas que en la vaina (pulpa) y semillas; asimismo, los compuestos fenólicos y flavonoides sólo se mostraron en las hojas, manifestando un contenido de compuestos fenólicos de 8,39 mg/Eq ácido gálico/ g de extracto seco por el método de Folin –Ciocalteu.
- El extracto etanólico de las hojas de *Prosopis pallida* presentó actividad antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus* con un CMI =1000 µg/mL y frente a *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 con un CMI = 62,5 µg/mL.
- Los extractos etanólicos de *Prosopis pallida* (algarrobo) mostraron actividad antioxidante *in vitro*, por el método DPPH un EC<sub>50</sub> de 456,75 µg/mL; 392,15 µg/mL y 309,10 µg/mL y por el método ABTS<sup>•+</sup> un EC<sub>50</sub> de 4,7 mg/mL; 10,39 mg/mL y 9,90 mg/mL para las hojas, vaina (pulpa) y semillas respectivamente.

## VII. RECOMENDACIONES

- Ampliar el estudio de la capacidad antioxidante de las hojas, vaina (pulpa) y semillas de *Prosopis pallida* mediante diferentes tipos de extracción, así como la determinación de sus sustancias activas.
- Realizar el análisis de la composición química de las hojas de *Prosopis pallida* que mostraron actividad antimicrobiana y antioxidante mediante métodos cromatográficos y espectrofotométricos.



## VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Prokopiuk D, Cruz G, Grados N, Garro O, Chiralt A. Estudio comparativo entre frutos de *Prosopis alba* y *Prosopis pallida*. American J Nat Resour. 2000; 9(1): 35-45.
2. Bussman RW, Glenn A, Sharon D, Chait G, Díaz D, Pourmand K, et al. Proving that Traditional Knowledge Works: The antibacterial activity of Northern Peruvian medicinal plants. Ethnobotany Res Appl. 2011; 9: 67-96.
3. Pasiecznik N. The *Prosopis juliflora* - *Prosopis pallida* complex: a monograph. HDRA Coventry. 2001.
4. World Health Organization. WHO traditional medicine strategy: 2014-2023. Ginebra: OMS; 2013.
5. Abadie R, Medina R, Ruiz L, Tresierra-Ayala A. Actividad antibacteriana de extractos vegetales frente a cepas intrahospitalarias, Iquitos-Perú. Rev ECI Perú. 2014; 11(1): 31-38.
6. Doroteo V, Díaz C, Terry C, Rojas R. Compuestos fenólicos y actividad antioxidante *in vitro* de 6 plantas peruanas. Rev Soc Quím Perú. 2013; 79 (1): 13-20.
7. Murphy M. Plant Products as Antimicrobial Agents. Rev Clin Microbiol. 1999; 12(4): 564–582.
8. Stich H. The beneficial and hazardous effects of simple phenolic compounds. Mutat Res. 1991; 259 (3-4): 307–324.
9. Mazzuca M, Kraus W, Balzaretti V. Evaluation of the biological activities of crude extracts from *Patagonian Prosopis* seeds and some of their active principles. J Herb Pharmacother 2003; 3: 31- 37.

10. Bussmann RW, Glenn A, Sharon D. Antibacterial activity of medicinal plants of Northern Peru – can traditional applications provide leads for modern science?. *Indian J Tradit Know*. 2010; 9(4): 742-753.
11. Seturaman D, Dahms H, Malliga P. Pharmacological potentials of phenolic compounds from *Prosopis spp*. *J Coast Life Med*. 2014; 2(11): 918-924
12. Muñoz A, Alvarado-Ortíz C, Blanco T, Castañeda B, Ruiz J, Alvarado A. Determination of phenolic compounds, total flavonoids and antioxidant activity in peruvian honey from different flower's sources. *Rev Soc Quím Perú*. 2014; 80(4): 287-297.
13. Schmeda H. et al. *Chilean Prosopis* mesocarp flour: phenolic profiling and antioxidant activity. *Molecules*. 2015; 20: 7017-7033.
14. Lakshmibai R, Amirtham D, Radhika S. Preliminary Phytochemical Analysis and Antioxidant Activities of *Prosopis Juliflora* and *Mimosa Pudica* leaves. *Int J Sci Eng Technol Res*. 2015; 4 (30): 5766-5770.
15. Dostert N, Roque J, Cano A, La Torre M, Weigend M. *Hoja botánica: Algarrobo*. 1a ed. Lima: Museo de Historia Natural- Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2012.
16. Flor E. Evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de algarrobo tropical (*Prosopis pallida*) H.B.K [Tesis]. Quito: Universidad Central del Ecuador; 2013.
17. Burghardt A, Magdalena M, Pía M, Albán L, Palacios R. Análisis numérico de las especies de *Prosopis L.* (Fabaceae) de las costas de Perú y Ecuador. *Rev Perú Biol*. 2010; 17(3): 317 - 323.

18. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. El Género *Prosopis* “Algarrobos” en América Latina y el Caribe. Distribución, Bioecología, Usos y Manejo [Monografía en Internet]. Roma: 2000. [accesado 10 de febrero 2016]. Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/006/ad314s/AD314S08.htm>
19. Lima P. Comportamiento silvicultural de especies de *Prosopis* [Tesis]. Universidad Federal de Parana. Brasil; 1994.
20. Bragg L, Bacon J, Mc Millan C, Mabry T. Flavonoid patterns in the *Prosopis juliflora* complex. *Biochem Syst Ecol.* 1978; 6(2): 113-116.
21. Cruz G, Del Re B, Amadò R. Contribución al estudio de la composición química de los frutos maduros del algarrobo. En: Resúmenes de la III Jornadas de Fotoquímica, Sociedad Química del Perú, Lima; 1987.
22. Galera F. Las especies del género *Prosopis* (Algarrobos) de América Latina con especial énfasis en aquellas de interés económico. [Monografía en Internet]. Córdoba: 2000. [accesado 10 de febrero 2016]. Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/006/AD314S/AD314S00.htm#TOC>
23. Quiñones M, Miguel M, Aleixandre A. Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. *Nutr Hosp.* 2012; 27(1): 76-89.
24. Gómez R, Martínez G, Rodríguez R. Fuentes y beneficios de los antioxidantes fenólicos. *Revista ciencia cierta* [Revista en Internet]. 2012 [accesado 20 de abril 2016]; 8(31). Disponible en: <http://www.posgradoeinvestigacion.uadec.mx/CienciaCierta/CC31/5.html>

25. Martínez- Valverde I, Periago M, Ros Gas. Significado nutricional de los compuestos fenólicos de la dieta. Rev ALAN. 2000; 50(1): 5-18.
26. Faulds C, Williamson G. The role of hidroxycinnamates in the plant cell wall. J Sci Food Agric. 1999; 79(3): 393-395.
27. Martínez S, González J, Culebras M, Tuñón M. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. Rev Nutr Hosp. 2002; 17(6): 271-278.
28. Escamilla C, Cuevas E, Guevara J. Flavonoides y sus acciones antioxidantes. Rev Fac Med UNAM. 2009; 52(2): 73-75.
29. De Rijke E, Out P, Niessen W, Ariese F, Gooijer C, Brinkman U. Analytical separation and detection methods for flavonoids. J Chromatogr A. 2006; 1112(1-2): 31–63.
30. Martínez C. Identificación de Flavonoides con actividad antioxidante presentes en *Alchornea Coelophylla* [Tesis]. Pereira: Universidad Tecnológica de Pereira; 2014.
31. Pablo S. Separación y evaluación del efecto antiinflamatorio y antioxidante de los flavonoides de *Eysenhardtia Polystachya* (Ort.) Sarg. [Tesis]. México D.F: Instituto Politécnico Nacional; 2011.
32. Lock O, Cabello I, Doroteo V. Análisis de flavonoides en plantas. Pontificia Universidad Católica del Perú; Departamento de Ciencias – Sección Química; 2006.
33. Pérez G. Los flavonoides: antioxidantes o prooxidantes. Rev Cubana Invest Biomed. 2003; 22(1): 48-37.
34. Cushnie T, Lamb A. Antimicrobial activity of flavonoids. Int J Antimicrob Agents. 2005; 26(5): 343–356.

35. Wang S, Zhang F, Feng Q, Li Y. Synthesis, characterization, and antibacterial activity of transition metal complexes with 5- hydroxy-7,4 – dimethoxyflavone. J Inorg Biochem. 1992; 46: 251–7.
36. Ward F, Garling D, Buckler R, Lawler D, Cummings D. Antimicrobial 3-methyleneflavanones. J Med Chem. 1981; 24: 1073–7.
37. Tsuchiya H, Sato M, Miyazaki T, Fujiwara S, Tanigaki S, Ohyama M, et al. Comparative study on the antibacterial activity of phytochemical flavanones against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J Ethnopharmacol. 1996; 50(1): 27–34.
38. Osawa K, Yasuda H, Maruyama T, Morita H, Takeya K, Itokawa H. Isoflavanones from the heartwood of *Swartzia polyphylla* and their antibacterial activity against cariogenic bacteria. Chem Pharm Bull. 1992; 40: 2970–4.
39. Sato M, Fujiwara S, Tsuchiya H, Fujii T, Linuma M, Tosa H, et al. Flavones with antibacterial activity against cariogenic bacteria. J Ethnopharmacol. 1996; 54(2-3): 171–6.
40. Peña C. Caracterización y estudio de la reactividad de extractos tánicos condensados e hidrolizables. Análisis de las propiedades físico-químicas y mecánicas de resinas fenólicas de tipo novolaca modificadas con dichos extractos [Tesis]. San Sebastián. Escuela Universitaria Politécnica; 2007.
41. Hernández A, García L, Rojo De, Olivares D. Almendro de la India: potencial biológico valioso. Rev Cubana Invest Bioméd [Revista en Internet] 2003 [Citado 22 Sep 2016]; 22(1). Disponible en:

[http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S086403002003000100006&lng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S086403002003000100006&lng=es).

42. Inocente M. Actividad antioxidante y antimicrobiana de los compuestos fenólicos del extracto hidroalcohólico de la corteza de *Triplaris americana* L. (Tangarana colorada) [Tesis]. Lima. Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2009.
43. Santamaría E. Comprobación del efecto cicatrizante de los extractos hidroalcohólicos de malva (*Malva sylvestris* L.) y aguacate (*P. americana*) en ratones (*Mus musculus*) [Tesis]. Riobamba. Escuela superior politécnica de Chimborazo; 2013.
44. Villar del Fresno, A. M<sup>a</sup>. 1999. "Farmacognosia General". España. Editorial Síntesis. Pág. 220.
45. Martínez T. Incremento de la disponibilidad intestinal de proteína y almidón mediante la manipulación de su degradabilidad en el rumen [Tesis]. Almería. Universidad de Almería; 2001.
46. Zhang J, Li L, King S, Hagerman A, Lu J. Anti-cáncer, anti-diabetic, and other pharmacologic and biological activities of penta-galloyl-glucose. Pharm Res. 2009; 26(9): 2066-80.
47. Jeong S, Koh W, Lee E, Lee J, Bae H, Lü J, et al. Antiangiogenic Phytochemicals and Medicinal Herbs. Phytother Res. 2011; 25(1): 1–10.
48. Vázquez A, Álvarez E, López J, Wall A, De la Rosa L. Taninos hidrolizables y condensados: naturaleza química, ventajas y desventajas de su consumo. Rev Tecnociencia. 2012; 6(2): 84-93.

49. Murphy M. Plant Products as Antimicrobial Agents. *Rev Clin Microbiol.* 1999; 12(4): 564–582.
50. Borris R. Natural products research: perspectives from a major pharmaceutical company. *J Ethnopharmacol.* 1996; 51(1-3): 29-38.
51. Brantner A, Males Z, Pepeljnjak S, Antolic A. Antimicrobial activity of *Paliurus spina-christi mill.* *J Ethnopharmacol.* 1996; 52(2): 119–122.
52. Mason T, Wasserman B. Inactivation of *red beet beta-glucan synthase* by native and oxidized phenolic compounds. *Phytochemistry.* 1987; 26(8): 2197–2202.
53. Duke J. Handbook of medicinal herbs. 2da Ed. Boca ratón: CRC Press; 2002. Disponible en: <https://www.crcpress.com/Handbook-of-Medicinal-Herbs-Second-Edition/Duke/p/book/9780849312847#googlePreviewContainer>. [accesado el 14 de Agosto].
54. Toda M, Okubo S, Ohnishi R, Shimamura T. Antibacterial and bactericidal activities of Japanese green tea. *Jpn J Bacteriol.* 1989; 44(4): 669-672.
55. Venereo J. Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Rev Cubana Med Milit.* 2002; 31(2): 126-33.
56. Millones C. Radicales Libres de Oxígeno y el uso de antioxidantes en un ejercicio forzado [Monografía en Internet]. Lima. Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2009. [accesado el 7 de junio del 2016]. Disponible en: [http://veterinaria.unmsm.edu.pe/files/radicales\\_libre\\_CM.pdf](http://veterinaria.unmsm.edu.pe/files/radicales_libre_CM.pdf).

57. González M; Betancourt M; Ortiz R. Daño Oxidativo y Antioxidantes. Bioquímica. 2000; 25(1): 3-9.
58. Córdova A, Ruiz C, Córdova C, Córdova M, Guerra J, Rodríguez B, et al. Estrés oxidativo y antioxidantes en la conservación espermática. Rev Complut Cien Vet. 2009; 3(1): 01-38.
59. Chura M. Efecto de la concentración de la raíz fresca de yacón "*Smallanthus tinchifolia*" en su capacidad antioxidante frente a la formación de radicales libres [Tesis]. Lima. Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2013.
60. Zorrilla A, Eirez M, Izquierdo M. Papel de los radicales libres sobre el ADN: carcinogénesis y terapia antioxidante. Rev Cubana Invest Bioméd. [Revista en Internet] 2004 [accesado mayo del 2016]; 23(1): [aprox. 3p.]. Disponible en: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0864-03002004000100008](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-03002004000100008)
61. Peralta M, Volke T. The antioxidant defense in plants: a key tool for phytoremediation. Revista Mexicana de Ingeniería Química. 2010; 11(1): 75-88.
62. Gechev T, Breusegem F, Stone J, Denev I, Laloi C. Reactive oxygen species as signals that modulate plant stress responses and programmed cell death. Bioessays. 2006; 28(11): 1091–1101.
63. Hernández J. Mecanismos antioxidantes de defensa (II): mecanismos enzimáticos. Murcia, España. [Actualizado el 30 de enero del 2013, citado el 10 de agosto del 2016]. Disponible



en:<https://cienciacebas.wordpress.com/2013/01/30/mecanismos-antioxidantes-de-defensa-ii-mecanismos-enzimaticos/>

64. Avello M, Suwalsky M. Radicales libres, antioxidantes naturales y mecanismos de protección. Atenea (Concepción). 2006; 2(494): 161-172.
65. Castillo M. Modelos de envejecimiento *in vitro* e *in vivo* estrés oxidativo y protección antioxidante [Tesis]. Alicante: Universidad de Alicante; 2002.
66. Núñez W, Quispe R. Evaluación antioxidante y antiinflamatoria *in vitro* y antiinflamatoria *in vivo* del extracto hidroalcohólico de la *Caesalpinia spinosa* “tara” [Tesis]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2015.
67. Pedhazur E.J, Schmelkin L.P. Measurement, design, and analysis. An integrated approach. Nueva York: Psychology Press; 1991.
68. Ávila M, Garrido-Latorre F, López S. Diseño de estudios epidemiológicos. Salud Públ Méx. 2000; 42(2): 144-154.
69. Lock de Ugaz O. Investigación fitoquímica. Métodos en estudios de productos naturales. 2a Edición. Lima: Fondo Editorial de la Pontificia Universidad Católica del Perú, Lima; 1994:8-10.
70. Zamacona X, Castro E. Identificación y obtención de alcaloides en variedades de mezquite *Prosopis juliflora* y *Prosopis pallida* [Monografía en Internet]. México: Universidad Autónoma de Querétaro; 2010. [actualizado el 18 de junio del 2010, citado el 2 de agosto del 2016].  
Disponibile en:<http://www.uaq.mx/investigacion/difusion/veranos/memorias->

2010/12%20Verano%20Ciencia%20Region%20Centro/UAQ%20Zam  
acona%20Montannez.pdf.

71. Skerget M, Kotnik P, Hadolin M, Hras A, Simonic M, Knez Z. Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities. *Food Chem.* 2005; 89(2): 191-198.
72. ISO 14502-1: Contenido de polifenoles totales en té – Método colorimétrico usando reactivo Folin-Ciocalteu. International Organization for Standardization. Génova. 2005.
73. Rojas R, Bustamante B, Bauer J, Fernández I, Albán J, Lock O. Antimicrobial activity of selected Peruvian medicinal plants. *J Ethnopharmacol.* 2003; 88(2-3): 199- 204.
74. Ruiz J. Actividad Antifúngica *In Vitro* y Concentración Mínima Inhibitoria mediante Microdilución de ocho plantas medicinales [Tesis]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2013.
75. Polo H. “Efecto Antibacteriano y Antifúngico comparativo de los extractos acuosos del *Zea Mays L.* (maíz morado), *Rubus glaucus* (mora andina); *Opuntia soherensii* (ayrampo) y Diseño de un gel de limpieza cutánea”. [Tesis]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2014.
76. Munayco E, Moromi H. Efecto antimicrobiano del extracto hidroalcohólico de *Allium sativum* sobre cepas estándares de la cavidad bucal. *Rev Odontol Sanmarquina.* 2013; 16(2): 21-24.
77. Elshikh M, Ahmed S, Funston S, Dunlop P, McGaw M , Marchant R, et al. Resazurin-based 96-well plate microdilution method for the

- determination of minimum inhibitory concentration of biosurfactants. *Biotechnol Lett.* 2016; 38(6): 1015-9.
78. Sarker SD, Nahar L, Kumarasamy Y. Microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the *in vitro* antibacterial screening of phytochemicals. *Methods.* 2007; 42(4): 321-4.
  79. Tovar Del Río J. Determinación de la actividad antioxidante por DPPH y ABTS<sup>•+</sup> de 30 plantas recolectadas en la ecorregión cafetera [Tesis]. Pereira: Universidad Tecnológica de Pereira; 2013.
  80. Kedare S, Singh R. Génesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *J Food Sci Tech.* 2011; 48(4): 412-422.
  81. Molyneux P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity Songklanakarin. *J Sci Technol.* 2004; 26(2): 211-219.
  82. Wayne D. Bioestadística. Bases para el análisis de las ciencias de la salud. México: 4ta. Edición. Edit. Limusa Wiley; 2002
  83. Thakur R, Singh R, Saxena P, Mani A. Evaluation of Antibacterial Activity of *Prosopis Juliflora* (SW.) DC. Leaves. *Afr J Tradit Complement and Altern Med.* 2014; 11(3): 182–188.
  84. Tajbakhsh S, Barmak A, Vakhshiteh F, Gharibi M. *In vitro* Antibacterial Activity of the *Prosopis Juliflora* Seed Pods on Some Common Pathogens. *J Clin Diagn Res.* 2015; 9(8): DC13-5

85. Herrera L. Pruebas de sensibilidad antimicrobiana: metodología de laboratorio. Rev méd Hosp Nac Niños (Costa Rica) [Revista en Internet]. 1999 [citado el 24 de Sep del 2016]; 34(Suppl): 33-41. Disponible en: [http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1017-85461999000100010&lng=en](http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1017-85461999000100010&lng=en).
86. Balouiri M, Sadiki M, Koraichi S. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. J Pharm Anal. 2016; 6(2): 71–79.
87. Poudineh Z, Amiri R, Najafi S, Mir N. Total phenolic content, antioxidant, and antibacterial activities of seed and pod of *Prosopis farcta* from Sistan region, Iran. Aza J Agric. 2015; 2(2): 51-56.
88. MERCK S.A. Industrias Químicas. Bioflavonoides: Quercetina y Rutina. Informe a Profesionales; 2000

## ANEXO 1

### Constancia de clasificación taxonómica

 UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS  
Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA  
  
**MUSEO DE HISTORIA NATURAL**

"Año de la Consolidación del Mar de Grau"

**CONSTANCIA N° 66-USM-2016**

LA JEFA DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM) DEL MUSEO DE HISTORIA NATURAL, DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS, DEJA CONSTANCIA QUE:

La muestra vegetal (rama de planta con frutos), recibida de **Cynthia CARDENAS CAMACHO**, estudiante de la Facultad de Farmacia y Bioquímica Universidad Nacional Mayor de San Marcos, ha sido estudiada y clasificada como: ***Prosopis pallida*** (Humboldt & Bonpland ex Willdenow) H.B.K.; Sin.: (***Prosopis limensis*** Bent.) y tiene la siguiente posición taxonómica, según el Sistema de Clasificación de Cronquist (1981):

**DIVISION: MAGNOLIOPHYTA**

**CLASE: MAGNOLIOPSIDA**

**SUB CLASE: ROSIDAE**

**ORDEN: FABALES**

**FAMILIA: MIMOSACEAE**

**GENERO: *Prosopis***

**ESPECIE: *Prosopis pallida*** (Humboldt & Bonpland ex Willdenow) H.B.K.  
Sin.: (***Prosopis limensis*** Bent.)

Nombre vulgar: "Algarrobo".  
Determinado por: Prof. Leopoldo Vásquez y Blgo. Severo Baldeón M.

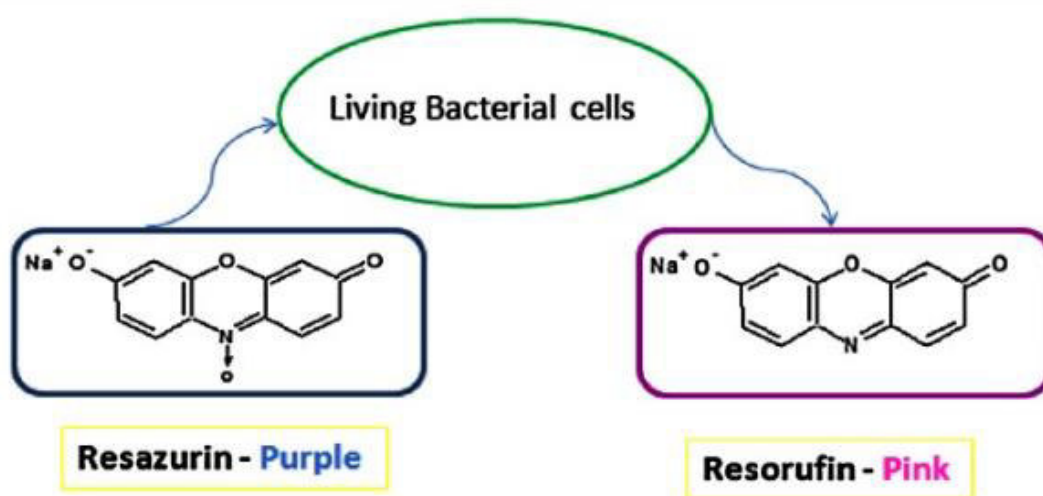
Se extiende la presente constancia a solicitud de la parte interesada, para fines de estudios.

Fecha, 02 de mayo de 2016

  
  
**Dra. HAYDEE MONTOYA TERREROS**  
JEFA DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM)

DD8

## ANEXO 2



**Figura 37:** Reducción de resazurina

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	CE	2000	1000	500	250	125	62,5	31,25	15,63	7,81	3,91	CP	M <sub>1</sub>
B	CE	2000	1000	500	250	125	62,5	31,25	15,63	7,81	3,91	CP	M <sub>1</sub>
C	CE	2000	1000	500	250	125	62,5	31,25	15,63	7,81	3,91	CP	M <sub>2</sub>
D	CE	2000	1000	500	250	125	62,5	31,25	15,63	7,81	3,91	CP	M <sub>2</sub>
E	CE	2000	1000	500	250	125	62,5	31,25	15,63	7,81	3,91	CP	M <sub>3</sub>
F	CE	2000	1000	500	250	125	62,5	31,25	15,63	7,81	3,91	CP	M <sub>3</sub>
G	CE	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	CP	C
H	CE	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	CP	C

**Figura 38:** Diseño de la placa de microdilución colorimétrica

### ANEXO 3

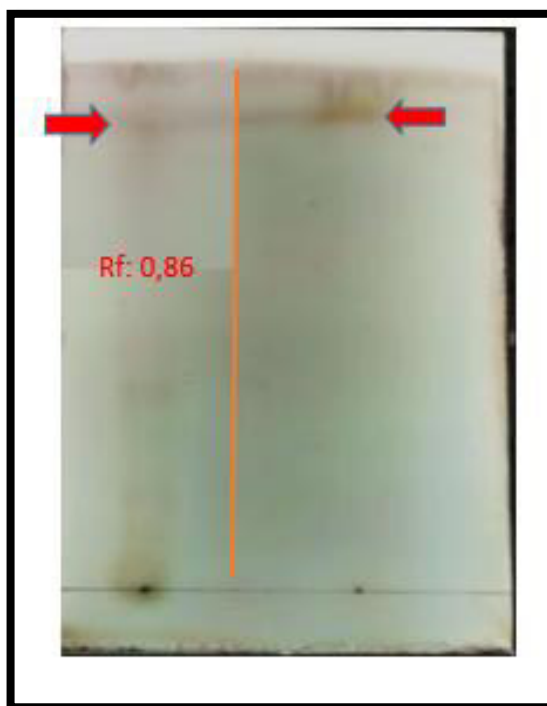


Figura 39: Cromatografía de identificación de flavonoides en las hojas de *Prosopis pallida*, con el reactivo de Sulfato de cerio vs estándar de quercetina.



Figura 40: Reacción de precipitación de taninos con gelatina, marcha fitoquímica del extracto etanólico de hojas de *Prosopis pallida*



Figura 41: Reacción de precipitación de taninos con gelatina, marcha fitoquímica del extracto etanólico de la vaina (pulpa) de *Prosopis pallida*

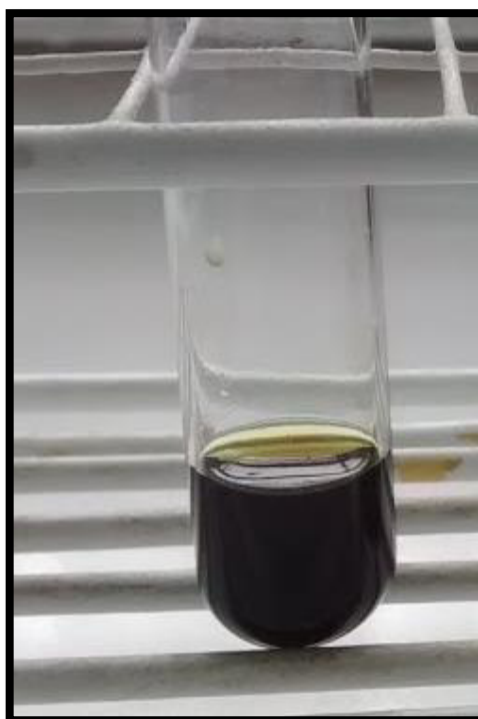


Figura 42: Reacción de identificación de compuestos fenólicos con cloruro férrico, marcha fitoquímica del extracto etanólico de las hojas de *Prosopis pallida*





Figura 43: Reacción de identificación de flavonoides con el reactivo de Shinoda, marcha fitoquímica del extracto etanólico de las hojas de *Prosopis pallida*